

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**E. A.P DE GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA**

**Cultivo primario de condrocitos a partir de cartílago  
hialino articular de *Equus Caballus* post-mortem**

**TESIS**

para optar al Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga

**AUTOR :**

**Diana Pamela Vegas Albino**

**Lima – Perú**

**2011**

## INDICE

AGRADECIMIENTOS	i
RESUMEN	iii
ABSTRACT	v
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	11
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	
4.1. Recolección y transporte de costillas de <i>Equus caballus</i> post-mortem	13
4.2. Obtención del cartílago esternocostal de <i>Equus caballus</i> post-mortem	14
4.3. Medios de cultivo	15
4.4. Aislamiento de condrocitos de cartílago esternocostal de <i>Equus caballus</i> post-mortem	15
4.5. Cultivo de condrocitos de cartílago esternocostal de <i>Equus caballus</i> post-mortem	16
4.6. Mantenimiento de las placas de cultivo	17
4.7. Resuspensión de los condrocitos cultivados antes de la evaluación	18
4.8. Evaluación de la proliferación celular	18
4.9. Evaluación de la supervivencia celular	18

## V. RESULTADOS

5.1. Obtención del cartílago esternocostal de <i>Equus caballus</i> post-mortem	20
5.2. Aislamiento de condrocitos de cartílago esternocostal de <i>Equus caballus</i> post-mortem	23
5.3. Cultivo de condrocitos de cartílago esternocostal de <i>Equus caballus</i> post-mortem	23
5.4. Evaluación del Cultivo Celular	27
– <i>Proliferación Celular:</i>	34
– <i>Supervivencia Celular:</i>	39

VI. DISCUSIÓN	43
---------------	----

VII. CONCLUSIONES	60
-------------------	----

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
--------------------------------	----

X. ANEXOS	65
-----------	----

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por guiar siempre mis pasos, por su infinita ayuda en todo lo que hago y por acompañarme siempre.

A mis padres, a mi hermanita Vanesa, a mis abuelos, a mis tíos y a toda mi familia por su paciencia y apoyo incondicional en cada una de las etapas de mi vida.

A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por ser mi alma mater, a la Facultad de Ciencias Biológicas por albergarme en sus aulas y a la Escuela Académico Profesional de Genética y Biotecnología por el apoyo brindado durante estos 5 años.

A la Universidad Ricardo Palma por promover el desarrollo de la investigación.

Al Dr. Hugo Gonzáles Figueroa, jefe del Laboratorio de Fisiología y Biotecnología Animal de la Universidad Ricardo Palma, por permitirme realizar este trabajo de tesis en su laboratorio y por el apoyo brindado.

Al M.Sc. Hugo Mauricio Gonzáles Molfino, mi asesor externo y docente investigador de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma, por guiarme durante la realización de este trabajo, por brindarme siempre su apoyo incondicional y por darme la oportunidad de aprender de él.

Al Mg. Fernando Retuerto Prieto, mi asesor interno y docente investigador de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por su apoyo brindado, por la revisión y discusión del presente trabajo.

A los miembros del jurado: Mg. Enrique Escobar G., Dr. Álvaro Marcelo R. y Blga. Betty Shiga O., por la revisión de este trabajo, las recomendaciones y todo su apoyo brindado.

A la Mg. Carmen Pantigoso F. y a la Mg. Patricia Woll T., por todo su apoyo en la parte administrativa para la sustentación de este trabajo.

A mis maestros, por inculcarme sus conocimientos y por brindarme su apoyo durante mi formación académica y personal.

A mis amigos Max Salvatierra Alor, Jonathan H. Vásquez Caveró,, Mayra Nohelia Mendoza Cerna, Yvette Verónica Villafani Bravo, César Diego Orihuela Tacuri y José Ricardo Linares Gonzáles por su amistad incondicional, por su ayuda y apoyo en la realización de este trabajo. Y a todos mis demás amigos por los buenos momentos compartidos en todo este tiempo dentro y fuera de las aulas.

## RESUMEN

El objetivo de esta tesis fue obtener un cultivo primario de condrocitos de *Equus caballus* post-mortem, aislados de cartílago hialino articular esternocostal.

Se colectaron un total de 24 de cajas torácicas de caballos beneficiados para consumo humano y animal, obtenidos del Camal de Equinos Casablanca ubicado en el distrito de Pachacamac, Lima; de cada una de ellas se obtuvieron 4 muestras de cartílago de forma semiovalada irregular de 0.8 cm de ancho, 0.6 cm de largo y 0.2 cm de alto aproximadamente. El aislamiento de condrocitos se realizó de forma mecánica, con la técnica de cuchillas cruzadas de Freshney (2005), y de forma enzimática con solución de tripsina 0.05 % con 0.5 g de EDTA, solución de collagenasa 0.2% y 0.04 %. Luego las células fueron cultivados en Basal Medium Eagle (BME) + 10% Suero Bovino Fetal (SBF), BME + 5%SBF, Tissue Culture Medium-199 (TCM-199) + 10%SBF y TCM-199 + 5%SBF; por un periodo de 10 días a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y 5% de humedad. Posteriormente, las células fueron resuspendidas de las placas en solución de tripsina (tripsina 0.05%, EDTA 0.2 g.), para contarlas en una cámara de Neubauer y así determinar la tasa de proliferación y la tasa de supervivencia.

Se observó un incremento en la proliferación celular tanto en BME como en TCM-199 con 10% de SBF, siendo la tasa de proliferación obtenida para BME+10%SBF de 4,550+/-1,366, para TCM-199+10%SBF de 3,709+/-1,183, para BME+5%SBF de 0,438+/-0,095 y para TCM-199+5%SBF de 0,388+/-0,093; por tanto, el medio de cultivo que obtuvo la mejor tasa de proliferación fue BME + 10%SBF. La tasa de supervivencia no superó el valor de 1 en todos los medios; sin embargo, la que se acercó más a este valor fue la obtenida con BME + 10%SBF (0.987+/-0.025).

En conclusión, se logró obtener un cultivo primario de condrocitos a partir de cartílago hialino articular esternocostal de *Equus caballus* post-mortem, siendo BME + 10% SBF el medio que presentó los mejores resultados.

## ABSTRACT

The objective of this thesis was to obtain a primary culture of chondrocytes from post-mortem *Equus caballus*, isolated from hyaline articular sternocostal cartilage.

We collected a total of 24 rib cages of benefit horses for human and animal consumption, obtained from Casablanca Equine Camal located in the district of Pachacamac, Lima; from each one we obtained 4 irregular semi-oval samples of 0.8 cm width, 0.6 cm long and 0.2 cm tall. The isolation of chondrocytes was performed mechanically, with the technique of cross blades from Freshney (2005), and so enzymatically with 0.05% trypsin solution with 0.5 g of EDTA, 0.2% and 0.04% collagenase solution. Then they were grown in Basal Medium Eagle (BME) + 10% Fetal Bovine Serum (FBS), BME + 5% FBS, Tissue Culture Medium-199 (TCM-199) + 10% FCS and TCM-199 + 5% FBS; for a period of 10 days at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> and 5% humidity. Subsequently, cells were resuspended from the plates in trypsin solution (trypsin 0.05%, EDTA 0.2 g.), to count them in a Neubauer chamber and to determine the proliferation rate and survival rate, respectively.

We observed an increase in cell proliferation in both BME and in TCM-199 with 10% FBS, the proliferation rate obtained for BME +10% FBS was  $4.550 \pm 1.366$ , for TCM-199 +10% FBS was  $3.709 \pm 1.183$ , for BME +5% FBS was  $0.438 \pm 0.095$  and for TCM-199 + 5 % SBF was  $0.388 \pm 0.093$ , therefore the culture medium that obtained the best proliferation rate was BME + 10% FBS. The survival rate did not exceed the value of 1 in all media, but the one closer to this value was the obtained with BME + 10% FBS ( $0.987 \pm 0.0025$ ).



In conclusion, it was possible to obtain a primary culture of chondrocytes from hyaline articular sternocostal cartilage of *Equus caballus* post-mortem, being BME + 10% FBS the medium which had the best results.

## I. INTRODUCCIÓN

---

Los defectos del cartílago articular, resultantes del daño traumático o enfermedades degenerativas, podrían requerir de estrategias de medicina regenerativa para la restauración del tejido funcional tanto biológica y mecánicamente. Un enfoque se basa en colocar células dentro de los vacíos creados por la remoción del tejido disfuncional o dañado. Las células implantadas dentro del lugar del daño podrían iniciar una respuesta de reparación a través de la regulación celular *de novo*. Esta estrategia es un reto importante para las actuales tecnologías de salud (Kisiday et al., 2002). Las técnicas quirúrgicas intentan reparar los tejidos basados en el principio de rellenar la lesión con células mesenquimales de la medula ósea, por medio de la abrasión, perforaciones y microfracturas. Sin embargo, las células que rellenan la lesión condral sintetizan tejido fibroso, o fibrocartílago, cuya composición y propiedades difieren de aquellas del tejido hialino original, como que no sintetizan colágeno tipo I. La presencia de tejido fibroso podría causarle al paciente dolor y un movimiento disparejo a largo plazo, por lo que se busca formar cartílago hialino articular similar al original, para lo cual el transplante autólogo de condrocitos es una alternativa para tratar lesiones condrales (Lombello et al., 2003).

Las lesiones traumáticas del cartílago articular predisponen al desarrollo de la osteoartritis (OA), conocida también como artrosis o enfermedad articular degenerativa, la cual es una enfermedad dolorosa que no tiene cura conocida y que aqueja a humanos, así como a animales que se encuentran en constante entrenamiento físico como perros y caballos. En el caso de estos últimos, los caballos son más propensos a sufrir lesiones traumáticas debido a las diferentes actividades de exhibición y deportivas que realizan. Además, las lesiones traumáticas y la OA vienen a ser las principales causas del retiro y muerte de caballos de carrera, por este motivo es considerado un problema relevante que amerita el desarrollo de alternativas de tratamiento; entre los cuales, el transplante autólogo de condrocitos viene a ser uno de los mejores a utilizar (Masri et al., 2006).

Este trabajo ha abordado experimentalmente el inicio de una de las alternativas de tratamiento como es la terapia celular. Se logró obtener un cultivo primario a partir de cartílago hialino articular de *Equus caballus* post-mortem, pero en lugar de emplear cartílago rotuliano como ha sido citado por varios autores, se empleó como innovación muestras de cartílago esternocostal de *Equus caballus* post-mortem. Esto debido a que si la lesión del animal se localiza en la articulación de la rodilla, sería preferible realizar el cultivo de células a partir de una muestra no comprometida, en este caso de la articulación esternocostal, para así no comprometer las otras tres articulaciones rotulianas sanas de dicho animal, porque implicaría tal vez causarle un daño adicional, que en su rehabilitación ocasionaría otro problema. Así mismo, se busca mejorar los conocimientos sobre el cultivo *in vitro* de condrocitos en *Equus caballus*, con el fin de que ésta pueda ser utilizada posteriormente como aporte en el mejoramiento del campo de la terapia celular, específicamente en la terapia regenerativa de cartílago.

## II. MARCO TEÓRICO

---

El cartílago articular es un tejido altamente especializado que protege los huesos de las articulaciones diartrodiales de las fuerzas asociadas con la carga y el impacto, y permite el movimiento casi sin fricción entre las superficies articulares (Steinert et al., 2007). Sin embargo, el cartílago articular tiene limitada capacidad intrínseca para repararse (Redman et al., 2005), por lo cual es necesario pensar en diferentes alternativas de tratamiento para este problema.

La matriz extracelular del cartílago articular es distinta a la de otros tejidos, consistiendo de una red intrincada que contiene principalmente fibras de colágeno y proteoglicanos. Los colágenos tipo II, IX y XI, forman un esqueleto fibroso que da al tejido su forma, resistencia y rigidez de tracción. El colágeno tipo VI es encontrado pericelularmente alrededor de los condrocitos, y el colágeno tipo X es encontrado en la calcificación del cartílago. Aunque el colágeno tipo I es el colágeno que más abunda en todo el cuerpo, el principal constituyente de la matriz del cartílago articular es el colágeno tipo II, comprendiendo el 80% al 90% del contenido total de colágeno. En el cartílago articular los proteoglicanos existen como largos agregados hidrofílicos, que

contienen el componente líquido y controlan el movimiento. El nivel de compactación de los proteoglicanos dentro del esqueleto de colágeno determinará el nivel de hidratación y, a su vez la rigidez del cartílago articular (Steinert et al., 2007).

De acuerdo a su estructura histológica, existen tres tipos fundamentales de cartílago: *cartílago fibroso o fibrocartílago*, *cartílago elástico* y *cartílago hialino*; que difieren entre sí en su función, pero principalmente en su estructura por la composición de su matriz extracelular, cuyos componentes hacen especiales a cada uno de estos tipos de cartílago.

## **1. CARTILAGO HIALINO**

Es un tejido altamente especializado derivado del mesénquima durante el desarrollo embrionario (Negri et al., 2007). En estado fresco, tiene un aspecto vidrioso azulado. En el individuo adulto, aparece en los cartílagos costales, como parte del esqueleto nasal, en la laringe, en la tráquea, en los bronquios y recubriendo las superficies articulares (Rosales, 2008). La función principal del cartílago hialino es facilitar el deslizamiento de superficies articulares cubriendo y transfiriendo el peso al hueso subyacente (Negri et al., 2007).

Las células del tejido cartilaginoso, denominadas condrocitos, componen únicamente un pequeño porcentaje del volumen del cartílago (1% a 12%), son grandes con un diámetro de 40 µm, sus requerimientos metabólicos son mucho menores que los de las células en tejidos vascularizados; además, secretan continuamente colágeno, glicosaminoglicanos (GAG), y elastina, cada una relacionada con las características biomecánicas, siendo su matriz extracelular rica en colágeno tipo II (Cantú, 2009). Los condrocitos más inmaduros

(condroblastos) y cercanos al pericondrio, se ubican en lagunas ovales, aplanados en sentido paralelo a la superficie; mientras que los condrocitos maduros se ubican más en la profundidad del cartílago, en lagunas más redondeadas. Las células jóvenes son fusiformes, con su eje mayor paralelo a la superficie, hacia el interior del cartílago adoptan forma ovalada y se hallan en los nidos celulares o grupos isógenos. En el cartílago fetal, las células son a menudo aplanadas y rara vez se observan nidos celulares (Rosales, 2008). A mayor profundidad los condrocitos son menos numerosos, de mayor tamaño, más redondos y con mayor actividad metabólica, a diferencia de los de la superficie que son menos activas (Rosales, 2008).

La matriz cartilaginosa constituye un material denso que se sitúa entre las lagunas de condrocitos que aporta resistencia y elasticidad al cartílago. Estructuralmente está constituida principalmente por fibras de colágeno (especialmente colágeno tipo II); a parte de otros componentes como los proteoglicanos. Las fibras de colágeno representan más del 40% del peso seco de la matriz cartilaginosa, siendo el colágeno tipo II el que conforma alrededor del 90-95% del contenido total de colágeno del cartílago hialino, por lo que usualmente es usado como un marcador de este tipo de cartílago; sin embargo, también está constituida por pequeñas cantidades de colágeno tipo IX, X y XI (Negri et al., 2007). Los proteoglicanos generalmente se encuentran unidos a una molécula grande de ácido hialurónico, por medio de un puente proteico, formando así agregados proteoglicanos o agrecanos; además, son el segundo componente más abundante del cartílago articular, constituyendo del 5 al 10% del peso total de este (Rosales, 2008). En estado fresco, la matriz contiene alrededor del 75% de agua, bajo la

forma de gel coloidal firme, lo cual permite la nutrición del cartílago por difusión de nutrientes y gases a través de la fase acuosa del gel (Rosales, 2008).

Las lesiones traumáticas en las articulaciones pueden ser de diferentes tipos y grados (Masri et al., 2006) y aumentan como consecuencia del trastorno físico de los tejidos, debido al estrés mecánico; esto podría ocurrir debido a que la articulación está siendo expuesta a cargas que exceden los límites fisiológicos (Riggs, 2006).

Existen tres principales tipos de daño del cartílago: *a) Daño de la matriz*; se produce la destrucción de ésta y los condrocitos la reparan incrementando su actividad de síntesis. *b) Daño parcial*; se produce la destrucción de la superficie del cartílago en la forma de fisuras y las células próximas empiezan a crecer pero no lo suficiente como para reparar la lesión completamente. *c) Daño en todo su espesor*; se produce justo debajo del hueso y es rellenado con fibrina formando fibrocartílago en lugar de cartílago hialino (Negri et al., 2007).

Una de las causas más frecuentes de las lesiones articulares es el daño de los tejidos osteocondrales debido a la fatiga ocasionada por la carga repetitiva, particularmente por alta velocidad. Esto es consistente con las observaciones clínicas de que la osteoartritis de la rodilla es más común en corredores y las lesiones del espolón son frecuentes en caballos de carrera. Las displasias de las articulaciones son raras en el caballo, aunque la malformación de la cavidad de la escápula en ponis Shetland recientemente ha sido asociada con la osteoartritis de la articulación de la espaldilla de esta raza (Riggs, 2006).

Los tejidos articulares comprometidos por la existencia de alguna enfermedad son más propensos al daño físico, debido a la existencia de una matriz estructuralmente

debilitada y/o al deterioro de la capacidad de iniciar procesos de reparación debido a la muerte celular o disfunción. Por ejemplo, la sinovitis es una condición primaria común en los caballos atléticos y es frecuentemente la precursora de las enfermedades más generalizadas y crónicas de las articulaciones, capaz de aumentar el daño osteocondral de secundario a primario, a través de los efectos de los mediadores inflamatorios, el desgaste del cartílago en fragmentos o la liberación de proteoglicanos en el líquido sinovial. Por otra parte, la osteoartritis (OA) es una enfermedad degenerativa del cartílago articular, que representa una etapa terminal de una serie de procesos patológicos, que podrían ser iniciados por un trauma en la articulación (Riggs, 2006); siendo su incidencia estimada en el mundo de aproximadamente 30 millones de casos y alrededor de 1.2 millones de daños focales (Negri et al., 2007). Todavía no hay una cura para la osteoartritis y no se ha demostrado que exista un tratamiento para detener el incremento progresivo de los signos de esta enfermedad (Masri et al., 2006); por lo que hasta la fecha las carreras de muchos caballos de competencia aún se ven afectadas o prematuramente reducidas a consecuencia de la cojera debido a la ocurrencia de esta enfermedad.

Además de la osteoartritis, considerada el principal problema que aqueja a los caballos deportivos, y de las fracturas que estos sufren a consecuencia de sus actividades, existen otros problemas propios del cartílago articular como su dificultad para sanar. Esto ha sido asociado a la incapacidad de los condrocitos para migrar al lugar del daño debido a la presencia de la matriz extracelular, a la poca cantidad de células del tejido (Negri et al., 2007), pero principalmente a su naturaleza no vascular, que impide que elementos provenientes de la médula ósea, como macrófagos, células endoteliales, células mesenquimatosas, etc., participen en la reparación del tejido (Masri et al., 2006), por lo que la lesión cartilaginosa usualmente resulta en la



formación de una cicatriz, consistente en fibrocartílago que tiene poca resistencia y capacidad de deformación, en lugar de la regeneración del cartílago hialino original (Negri et al., 2007). El fibrocartílago es un tejido de reparación que difiere del cartílago hialino en que es menos durable, menos organizado y tiene una mayor proporción de colágeno tipo I que este último (Trice et al., 2009); además, es biomecánicamente inferior y se deteriora rápidamente cuando se somete a un ejercicio continuo (Masri et al., 2006), por lo que es recomendable que las lesiones condrales sean reparadas con cartílago hialino y no con fibrocartílago. En la práctica veterinaria, estos problemas son comunes y afectan a la mayoría de los caballos deportivos (Masri et al., 2006); siendo razones suficientes como para continuar con la búsqueda de terapias alternativas para la reparación del cartílago articular, no solo a favor de la industria equina, que viene sufriendo pérdidas de millones de dólares al año por causa de daños del cartílago articular de caballos de carrera y de exhibición; sino también, a favor de la salud humana, siendo estas avances importantes para la medicina contemporánea y una futura aplicación en forma clínica.

Actualmente, el tratamiento más común para una lesión articular es crear microfracturas y sangrado en el hueso subcondral, intentando así estimular la regeneración del cartílago; sin embargo, el cartílago formado no posee las características biomecánicas del cartílago articular original (cartílago hialino) lo que lleva a resultados inconsistentes a largo plazo; también se ha utilizado el implante autólogo de condrocitos en la articulación (Cantú, 2009). Las técnicas para modular la reparación en caballos incluyen: curetaje, condrectomía parcial, perforaciones subcondrales, artroplastia por abrasión, injertos de periostio o de cartílago esternal, aloinjertos y autoinjertos osteocondrales, microfracturas, mosaicoplastia y recientemente autoinjertos de condrocitos (Masri et al., 2006).

El trasplante de condrocitos autólogos parece ser una buena opción de tratamiento, ya que la utilización de tejido heterólogo tiene el inconveniente de necesitar inmunosupresión para evitar el rechazo. En la actualidad, el trasplante autólogo, se ha vuelto el estándar de oro para la reconstrucción de tejidos para una serie de patologías que implican pérdida tisular, entre las que se encuentran las malformaciones congénitas, traumatismos, resecciones por cáncer, así como para la reparación de músculo, hueso y cobertura cutánea después de quemaduras. Sin embargo, los principales inconvenientes que este afronta, son los riesgos quirúrgicos, la dificultad técnica y la morbilidad del área donadora (Cantú, 2009).

Existen grupos de investigadores que han abordado el trasplante de condrocitos autólogos, con la teoría de que a partir del cartílago no comprometido se podría obtener una muestra pequeña de condrocitos por medio de digestión enzimática. Estas células podrían crecer *in vitro*, y al obtener una cantidad suficiente, combinarse con un andamio o polímero biológicamente compatible, y ser transplantado en el sitio deseado para restaurar la función (Cantú, 2009). Sin embargo, la restauración de la lesión a través de esta técnica depende en gran medida del éxito del cultivo celular, el cual a su vez depende desde su correcta elaboración con una técnica aséptica, como la protección del personal con guantes, mascarillas, etc. y equipos de filtración de aire en el ambiente de trabajo, y con la disponibilidad de un laboratorio de cultivo celular equipado como mínimo con: una cámara de flujo laminar, un incubador de CO<sub>2</sub>, una estufa, un baño maría y un microscopio invertido. Además de, mantener las adecuadas condiciones del cultivo, como el tipo de sustrato a utilizarse (material del recipiente de cultivo como placas de poliestireno, vidrio, etc.), la cantidad de oxígeno y dióxido de carbono del ambiente, y las condiciones fisicoquímicas (pH, osmolaridad, temperatura y viscosidad), nutricionales (composición del medio de cultivo) y fisiológicas (hormonas, factores de crecimiento, suero, etc.). Así mismo, del correcto

aislamiento de las células a partir de una muestra, empleando técnicas como la hidrólisis enzimática (por ejemplo con tripsina, colagenasa y/o pronasa) y la disgregación mecánica (por ejemplo con la técnica de cuchillas cruzadas, que consiste en el uso de dos bisturís entrecruzados, para cortar un trozo de tejido en partes pequeñas). También, de la adecuada elección del medio de cultivo para determinados tipos celulares, entre los que podemos mencionar a los medios básicos, como el MEM (Minimum Essential Medium), DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) y GMEM (Glasgow Minimum Essential Medium), y a los medios complejos como RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium) y Leibovitz L-15. Finalmente, de la seguridad biológica, evitando la contaminación del cultivo con hongos y bacterias, a través de la suplementación del medio con antibióticos y antimicóticos (Freshney, 2005).

Las técnicas de reparación y restauración de lesiones en el cartílago articular han ido mejorando a lo largo de los años con diferentes investigaciones y en la actualidad son las opciones de tratamiento más inmediatas a usarse en un futuro; aunque aún se encuentran en fase clínica experimental, son consideradas las más prometedoras en cuanto a tratamiento de lesiones en el cartílago se refiere.

### III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

#### 3.1. FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS

##### a. HIPÓTESIS GENERAL:

Es posible obtener un cultivo primario de condrocitos a partir de cartílago hialino articular esternocostal de *Equus caballus* post-mortem, que presente proliferación celular y que además sea viable y normal.

##### b. HIPÓTESIS NULA ( $H_0$ ):

No es posible obtener un cultivo primario de condrocitos a partir de cartílago hialino articular esternocostal de *Equus caballus* post-mortem, que presente proliferación celular y que además sea viable y normal.

### 3.2. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

#### a. OBJETIVO GENERAL:

Obtención de un cultivo primario de condrocitos obtenidos a partir de cartílago hialino articular esternocostal de *Equus caballus* post-mortem.

#### b. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Obtener un cultivo primario de condrocitos obtenidos a partir de cartílago hialino articular esternocostal de *Equus caballus* post-mortem, empleando dos medios alternativos de cultivo: Basal Medium Eagle (BME) y Tissue Culture Medium-199 (TCM-199); suplementados con diferentes concentraciones de Suero Bovino Fetal (SBF).
- Determinar la tasa de crecimiento celular de los condrocitos obtenidos por cultivo celular *in vitro* a partir de cartílago hialino articular esternocostal de *Equus caballus* post-mortem.
- Determinar la viabilidad de los condrocitos obtenidos por cultivo celular *in vitro* a partir de cartílago hialino articular esternocostal de *Equus caballus* post-mortem.
- Determinar entre el BME y el TCM-199, el medio adecuado, si se desea emplear un medio alternativo al DMEN, para la obtención de un cultivo primario de condrocitos obtenidos a partir de cartílago hialino articular esternocostal de *Equus caballus* post-mortem; de acuerdo a las variables evaluadas: viabilidad celular, proliferación celular y normalidad celular.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 4.1. Recolección y transporte de costillas de *Equus caballus* post-mortem

Se colectaron un total de 24 cajas torácicas, que comprendían 4 pares de costillas verdaderas unidas al esternón, de caballos destinados para consumo humano y animal (alimento procesado para perros, gatos, etc.), respectivamente; obtenidos del Camal de Equinos Casablanca ubicado en el distrito de Pachacamac, Lima (Fig. 1). Estos fueron transportados al Laboratorio de Biología del Desarrollo y Fisiología Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma, por un periodo de 1 a 2 horas desde la muerte del animal.

La recolección y transporte de las muestras se realizó en bolsas de plástico. Las colectas se realizaron entre Diciembre del 2009 y Marzo del 2010.

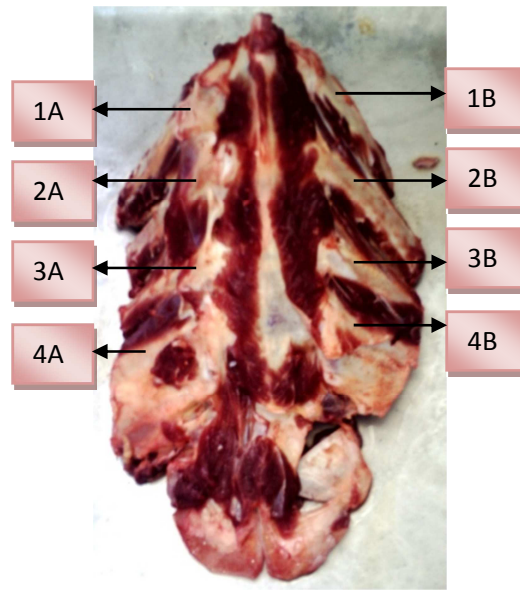


Fig. 1 Pieza de caja torácica de *Equus caballus* post-mortem que comprende cuatro pares de costillas (1A-4B).

#### 4.2. Obtención del cartílago esternocostal de *Equus caballus* post-mortem

Se realizaron dos cortes transversales (en los espacios entre las costillas) y un corte longitudinal (en la parte posterior de cada costilla) del material que la rodea (tejido muscular y adiposo) empleando una tijera recta, a modo de liberarla, para luego extraerla de forma mecánica. La extracción consistió en aplicar una fuerza hacia abajo con una mano en el extremo de la costilla, sujetando toda la pieza con la otra, logrando así el desprendimiento total de la costilla; no obstante, si algún tejido mantenía la costilla unida a la pieza, éste fue cortado empleando un bisturí N° 12. Las costillas se colocaron en un beaker de 500 ml.

Cada costilla fue sujeta con una pinza ratón y colocada en una placa petri para limpiar la zona del cartílago. Empleando un bisturí N° 10 se retiró todo resto de tejido muscular y adiposo. Luego de exponer completamente el cartílago articular,

por precaución se retiró una delgada capa superficial con un bisturí N° 10. Empleando otro bisturí se cortaron 4 piezas del cartílago articular de aproximadamente 0.7 a 1 cm<sup>3</sup>; sin embargo, si las piezas contenían algún excedente tisular, este fue removido empleando un bisturí del mismo número. Finalmente cada pieza de cartílago completamente limpia fue colocada, empleando una pinza relojero, en un vial con 5ml de Buffer Fosfato Salino (PBS) a 38 °C para mantenerla y eliminar cualquier excedente celular.

#### **4.3. Medios de cultivo**

Se emplearon dos tipos de medios de cultivo con dos concentraciones de Suero Bovino Fetal (SBF) 5% y 10%. Por ser una muestra trabajada por primera vez, se empleó un medio básico como el Basal Medium Eagle (BME) (Tabla 10) y un medio más complejo como el Tissue Culture Medium-199 (TCM-199) (Tabla 11), todos suplementados con tetraciclina (20 µg/ml) y fungozil (30 µg/ml).

#### **4.4. Aislamiento de condrocitos de cartílago esternocostal de *Equus caballus* post-mortem**

Se colocó la pieza de cartílago en una placa petri y se agregó 250 µL de BME o TCM-199 a 38 °C, según sea el caso, para evitar la deshidratación del tejido. Se empleó la técnica de cuchillas cruzadas, que consiste en el uso de 2 bisturís entrecruzados, para cortar la pieza en partes pequeñas (Freshney, 2005). Luego de disgregar el tejido, éste fue recogido de la placa empleando los bisturís que se usaron para el corte y fue colocado en un tubo falcon con 10 ml del mismo medio



empleado para la disgregación del tejido. Se realizaron 2 lavados consecutivos con el medio, que consistieron en centrifugar a 2000 rpm por 10 minutos cada vez.

Luego de lavar el tejido disgregado, al precipitado de la última centrifugación se le añadió 10 ml de solución de tripsina 0.05 % con 0.5 g de EDTA; se mezcló empleando un vortex mixer y se dejó reposar por 25 minutos a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> y 5% de humedad. Pasado ese tiempo, se centrifugó a 2000 rpm por 10 minutos, se decantó el sobrenadante y se realizaron 2 lavados consecutivos con 10 ml de BME o TCM-199, que consistieron en centrifugar a 2000 rpm por 10 minutos cada vez.

Luego, al precipitado de la última centrifugación, se le añadió 10 ml de solución de colagenasa 0.2%, se mezcló empleando un vortex mixer y se dejó reposar por 25 minutos a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> y 5% de humedad. Pasado ese tiempo, se centrifugó a 2000 rpm por 10 minutos, se decantó el sobrenadante y se agregó 10 ml de solución de colagenasa al 0.04 %, se mezcló empleando un vortex mixer y se dejó incubando toda la noche a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> y 5% de humedad.

#### **4.5. Cultivo de condrocitos de cartílago esternocostal de *Equus caballus* post-mortem**

Se mezcló la suspensión incubada toda la noche, bajo las condiciones descritas anteriormente, empleando un vortex mixer y se centrifugó a 2000 rpm por 15 minutos, se decantó y se agregó 10 ml de BME para nuevamente centrifugar a 2000 rpm por el mismo tiempo, este último paso se realizó 2 veces con el fin de lavar completamente las células.

Luego, al precipitado de la última centrifugación, se le añadió 10 ml de uno de los medios de cultivo: BME + 10% SBF, BME+ 5% SBF, TCM-199 + 10% SBF o TCM-199 + 5% SBF; y se mezcló empleando un vortex mixer. Finalmente, empleando una micropipeta de 1000 µL, se mezcló lentamente y se procedió a sembrar 3 ml de la suspensión en una placa petri de 35 x 10 mm. De cada muestra se realizaron 3 repeticiones. Las placas fueron incubadas a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> y 5% de humedad por un periodo de 10 días.

#### **4.6. Mantenimiento de las placas de cultivo**

Con una micropipeta de 1000 µL se retiró el medio de cultivo de la placa, se añadió 1 ml de PBS y se agitó la placa en forma circular sobre una superficie plana. Luego, se retiró el PBS y se realizó el lavado 2 veces más. Posteriormente, se añadió 1 ml de BME o TCM-199 según sea el caso y se realizó el mismo procedimiento de lavado 2 veces. Finalmente, se añadió 3 ml de uno de los medios mencionados en el párrafo anterior y se volvió a incubar a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> y 5% de humedad. El primer mantenimiento de las placas se realizó a los 4 días de iniciado el cultivo; luego el cambio de medio se realizó cada 3 días, sin embargo el último lavado no se realizó el día 10 sino el 9, ya que el 10 era el día del conteo final de células, entonces se decidió cambiar el medio un día antes para que así las células aprovechen mejor los nutrientes del medio.

#### **4.7. Resuspensión de los condrocitos cultivados antes de la evaluación**

Las células de cada placa fueron removidas con 0.5 ml de solución de tripsina (tripsina 0.05%, EDTA 0.2 g.) a 37 °C por 5 minutos, moviendo la placa ocasionalmente en forma circular para permitir la liberación de las células; pasado este tiempo, se agregó 2.5 ml de BME o TCM-199 para detener la acción de la tripsina. Empleando una micropipeta de 1000 µL se pasaron los 3 ml de la suspensión a un tubo falcon, se centrifugó a 1500 rpm por 10 minutos, se decantó y se agregó 10 ml de uno de estos medios y se volvió a centrifugar.

#### **4.8. Evaluación de la proliferación celular**

Para la evaluación de la proliferación celular se mezcló en una placa petri 50 µL de solución giemsa 4 % y 50 µL de la muestra. El conteo se realizó con una cámara de Neubauer, utilizando un microscopio óptico de campo claro con objetivo 10X. La evaluación se realizó antes del cultivo (Conteo Inicial de células) y post-cultivo (Conteo Final de células).

#### **4.9. Evaluación de la supervivencia celular**

De la misma forma que en la evaluación de la proliferación celular, se mezcló en una placa petri 50 µL de solución azul de tripán 4% y 50 µL de la muestra. El conteo se realizó con una cámara de Neubauer, utilizando un microscopio óptico de campo claro con objetivo 10X.

La evaluación se realizó antes del cultivo (Porcentaje de Supervivencia inicial) y post-cultivo (Porcentaje de Supervivencia final). Para el análisis estadístico, se

aplicó la función arcoseno a los porcentajes de supervivencia tanto inicial como final, para así luego poder emplear estos datos en un cociente (Porcentaje de Supervivencia Inicial/Porcentaje de Supervivencia Final) que nos represente la Tasa de Supervivencia celular.

*Nota: Las células muertas absorbieron el azul de tripán, mientras que las vivas no.*

## V. RESULTADOS

---

### 5.1. Obtención del cartílago esternocostal de *Equus caballus* post-mortem

Se obtuvieron 24 piezas de cartílago articular (C1-C24), de las cuales se cortaron 4 muestras de forma semiovalada irregular de 0.8 cm de ancho, 0.6 cm de largo y 0.2 cm de alto aproximadamente, de color perla azulada característico del cartílago articular (Fig.2). Inmediatamente luego de su extracción, cada pieza fue pesada para establecer una relación entre el peso de cada pieza y el número de células. Los pesos de las piezas de cartílago articular oscilaron entre 0,0398 y 0,0878 gramos, los datos para cada una de las muestras se detallan en la Tabla 1.

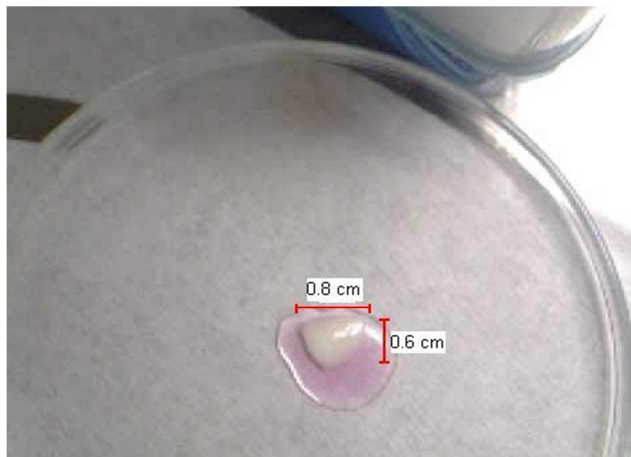


Fig. 2 Pieza del cartílago articular de *Equus caballus* post-mortem en medio BME.  
Dimensiones de la pieza: 0.8 cm de ancho y 0.6 cm de largo

*Tabla 1: Peso en gramos de las cuatro piezas obtenidas a partir de las 24 muestras evaluadas (de C1 a C24) y Promedio del Peso Total*

<b>MUESTRA</b>	<b>Pieza 1 (gramos)</b>	<b>Pieza 2 (gramos)</b>	<b>Pieza 3 (gramos)</b>	<b>Pieza 4 (gramos)</b>	<b>Promedio del Peso Total</b>
<b>C1</b>	0,0456	0,0432	0,0421	0,0472	0,0445
<b>C2</b>	0,0501	0,0498	0,0489	0,0521	0,0502
<b>C3</b>	0,0428	0,0442	0,0435	0,0398	0,0426
<b>C4</b>	0,067	0,0551	0,0659	0,0653	0,0633
<b>C5</b>	0,0517	0,0462	0,0514	0,0529	0,0506
<b>C6</b>	0,0585	0,0592	0,0579	0,0596	0,0588
<b>C7</b>	0,0535	0,0584	0,0542	0,0503	0,0541
<b>C8</b>	0,0531	0,0499	0,0528	0,0532	0,0523
<b>C9</b>	0,0569	0,0572	0,058	0,0561	0,0571
<b>C10</b>	0,0878	0,084	0,054	0,086	0,0780
<b>C11</b>	0,0541	0,0593	0,0534	0,0545	0,0553
<b>C12</b>	0,0621	0,0636	0,0627	0,0622	0,0627
<b>C13</b>	0,0816	0,0871	0,0864	0,0862	0,0853
<b>C14</b>	0,0475	0,0427	0,0459	0,0451	0,0453
<b>C15</b>	0,0513	0,0529	0,051	0,0507	0,0515
<b>C16</b>	0,0784	0,0732	0,0775	0,0743	0,0759
<b>C17</b>	0,0598	0,0612	0,0592	0,0582	0,0596
<b>C18</b>	0,0532	0,0576	0,0512	0,0524	0,0536
<b>C19</b>	0,0796	0,0783	0,0793	0,0773	0,0786
<b>C20</b>	0,0684	0,0661	0,0657	0,0671	0,0668
<b>C21</b>	0,0574	0,0522	0,0583	0,0548	0,0557
<b>C22</b>	0,0625	0,0681	0,0629	0,0621	0,0639
<b>C23</b>	0,0492	0,0562	0,0487	0,0485	0,0507
<b>C24</b>	0,0599	0,0635	0,0573	0,0526	0,0583

## **5.2. Aislamiento de condrocitos de cartílago esternocostal de *Equus caballus* post-mortem**

Cada una de las 4 piezas de las 24 muestras de cartílago articular esternocostal fueron disociadas aproximadamente en un 80% empleando la técnica de cuchillas cruzadas descrita por Freshney (2005); sin embargo, se obtuvieron trozos de entre 0.1 a 0.2 cm<sup>3</sup> que no pudieron ser disgregados mecánicamente, por lo que se requirió además emplear la disgregación enzimática con tripsina y colagenasa, como se explicó en la metodología. Sin embargo, a pesar de la acción de estas enzimas solo se logró aislar un 80% del total de las células, ya que se observaron algunos trozos de entre 0.1 a 0.2 cm<sup>3</sup> que no pudieron ser disgregados; no obstante, estos fueron menos que los observados luego de la disgregación mecánica.

## **5.3. Cultivo de condrocitos de cartílago esternocostal de *Equus caballus* post-mortem**

La CIC (cél/ml) osciló entre 13750 – 32900 cél/ml; mientras que el Si% osciló entre 40,106 - 99,120 %, los datos para las 24 muestras evaluadas se detallan en la Tabla 2.



*Tabla 2: Concentración inicial de células (CIC) y Porcentaje de supervivencia inicial (Si%) de las cuatro piezas obtenidas a partir de las 24 muestras evaluadas (de C1 a C24)*

MUESTRA	Pieza 1		Pieza 2		Pieza 3		Pieza 4	
	CIC (cél/ml)	Si%	CIC (cél/ml)	Si%	CIC (cél/ml)	Si%	CIC (cél/ml)	Si%
C1	16050	82,136	14800	81,401	14150	80,153	16950	80,393
C2	19300	91,634	19150	92,355	18400	90,420	20350	90,729
C3	14500	44,492	15650	44,974	14950	45,481	13750	44,720
C4	29400	80,805	22800	81,623	28950	80,132	28700	80,192
C5	20150	51,591	16400	52,122	20050	52,460	21000	51,964
C6	24700	81,496	25350	81,630	24150	80,973	25700	81,985
C7	21600	63,217	24650	63,582	22250	64,112	19400	63,103
C8	21400	61,840	19250	61,012	20800	61,735	21450	61,988
C9	23450	40,106	23600	40,873	24250	41,292	23050	41,159
C10	32900	72,174	32000	71,553	21950	70,465	32050	71,409
C11	22050	61,855	25550	62,651	21550	62,108	22400	62,350
C12	26850	53,538	28050	53,586	27450	53,894	26950	53,672
C13	31850	52,858	32500	51,970	32250	51,563	32150	52,382
C14	17150	83,319	14450	82,782	16250	82,571	15900	82,193
C15	19850	80,983	20950	80,019	19750	79,194	19550	79,723
C16	31250	63,200	30100	64,692	30650	64,723	30400	63,152
C17	25950	81,725	26500	81,916	25450	81,500	24350	81,583
C18	21450	60,419	23950	59,788	19800	59,916	20650	59,962
C19	31500	66,982	31150	67,126	31400	67,540	30600	66,833
C20	29950	94,771	29000	99,120	28800	95,316	29450	95,035
C21	23700	77,459	20400	77,143	24550	75,860	22550	75,936
C22	27250	80,714	29900	81,573	27550	81,659	26800	80,415
C23	18750	79,833	23150	80,423	18100	81,247	17950	80,973
C24	26100	81,316	27900	81,503	23650	81,425	20750	81,252

También, se estableció una relación entre el peso de las muestras y el número de células contenidas en estas, es decir la CIC, los datos se muestran en la Tabla 3 y en la Fig. 3

*Tabla 3: Peso Promedio y Concentración inicial de células (CIC) Promedio de las cuatro piezas obtenidas a partir de las 24 muestras evaluadas (de C1 a C24)*

<b>MUESTRA</b>	<b>PESO PROMEDIO (x10-5 gramos)</b>	<b>CIC PROMEDIO (cél/ml)</b>
<b>C1</b>	4452,5	15487,5
<b>C2</b>	5022,5	19300
<b>C3</b>	4257,5	14712,5
<b>C4</b>	6332,5	27462,5
<b>C5</b>	5055	19400
<b>C6</b>	5880	24975
<b>C7</b>	5410	21975
<b>C8</b>	5225	20725
<b>C9</b>	5705	23587,5
<b>C10</b>	7795	29725
<b>C11</b>	5532,5	22887,5
<b>C12</b>	6265	27325
<b>C13</b>	8532,5	32187,5
<b>C14</b>	4530	15937,5
<b>C15</b>	5147,5	20025
<b>C16</b>	7585	30600
<b>C17</b>	5960	25562,5
<b>C18</b>	5360	21462,5
<b>C19</b>	7862,5	31162,5
<b>C20</b>	6682,5	29300
<b>C21</b>	5567,5	22800
<b>C22</b>	6390	27875
<b>C23</b>	5065	19487,5
<b>C24</b>	5832,5	24600

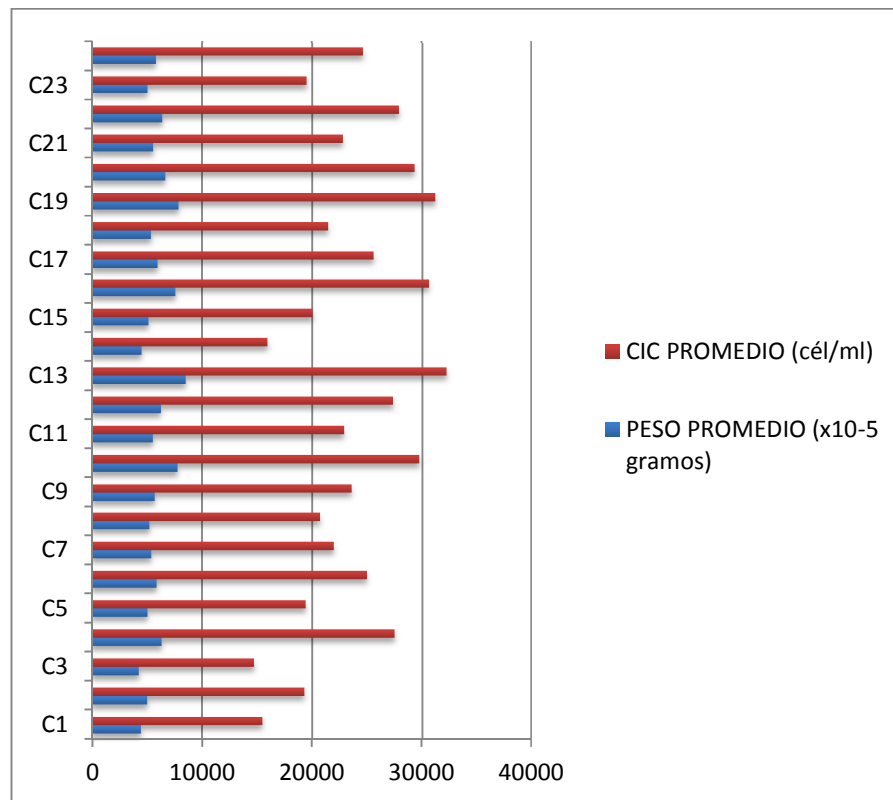


Fig. 3 Comparación de la variación entre el Peso Promedio (x10-5 gramos) y el CIC Promedio (cél/ml) para las 24 muestras evaluadas (C1-C24)

Como podemos observar en la figura anterior, a mayor peso mayor CIC, con esto podemos afirmar que a pesar de haber pasado por diferentes etapas de disgregación, tanto mecánica como enzimática, la proporción del número de células con relación al peso se mantuvo, es decir no se produjeron pérdidas relevantes de células que posteriormente hayan podido afectar los resultados sobre la concentración inicial.

No se estableció relación con el Si%, ya que esta variable no depende del peso o del número de células que contiene cada muestra, sino de la calidad de la misma, en este caso, las muestras de cartílago esternocostal empleadas fueron de caballos

sanos adultos, lo cual es acreditado por el Dr. Antezana (Médico Veterinario del Camal de Caballos Casablanca).

#### 5.4. Evaluación del Cultivo Celular

Durante los 10 días del cultivo, se observó una clara expansión celular a lo largo de la placa (Fig. 4), junto con la formación de agrupaciones de condrocitos, lo cual es característico de la proliferación de esta línea celular; además, las células presentaron una morfología redondeada al final del cultivo, lo cual es representativo de un condrocito maduro. En la Fig. 5 se pueden observar las placas de cultivo de condrocitos luego de los 10 días de cultivo en cada uno de los medios evaluados.

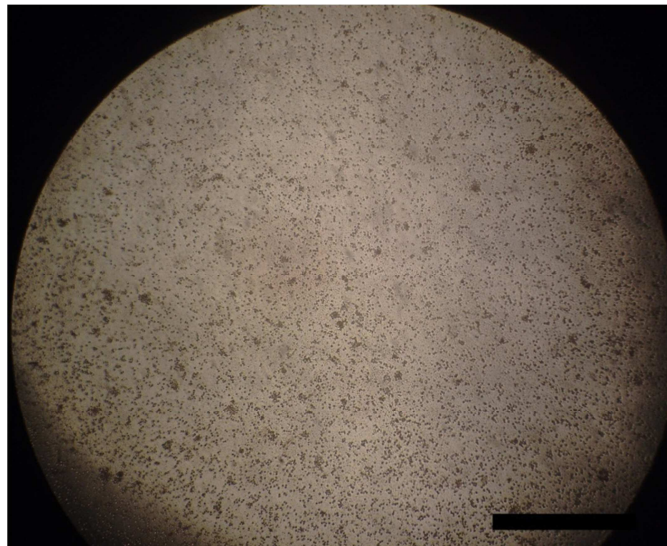


Fig. 4 Placa de cultivo de condrocitos de *Equus caballus*, en medio BME + 10% SBF  
(400X)

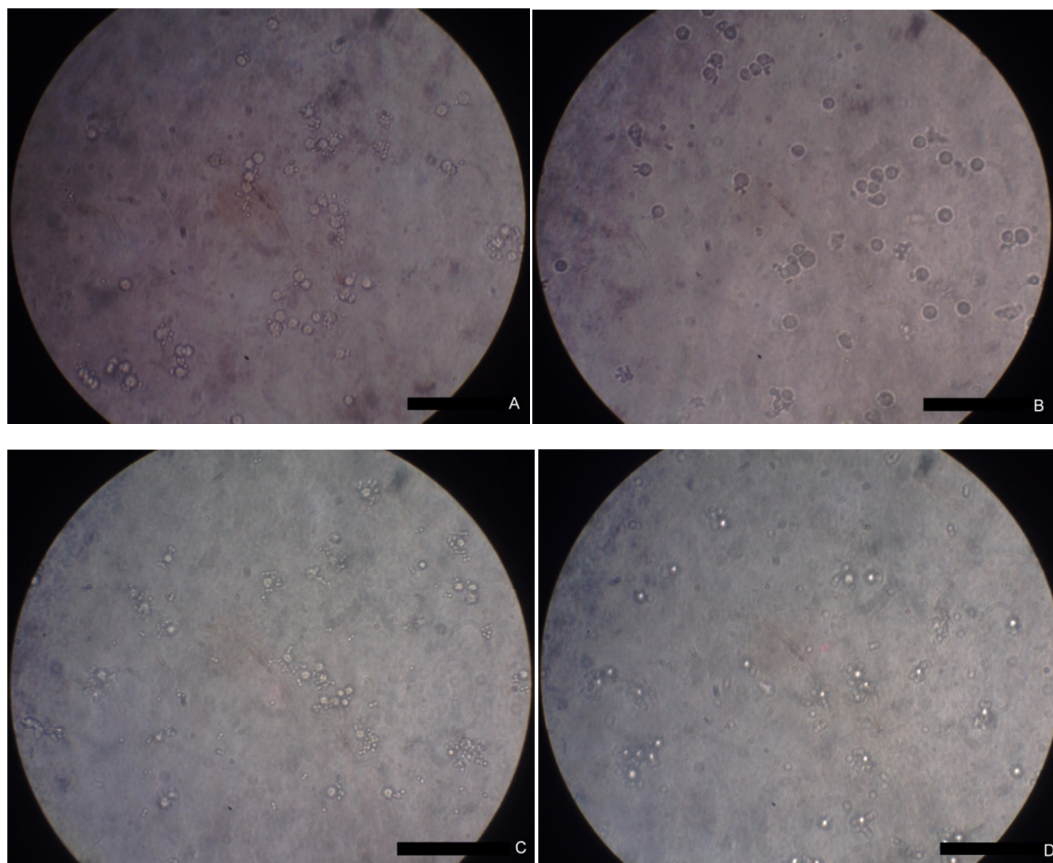


Fig. 5 Cultivos de condrocitos de *Equus caballus* post-mortem (600 X) en medio BME + 10%SBF (A), TCM-199 + 10%SBF (B), BME + 5%SBF (C) y TCM-199 + 5%SBF (D)

De la misma forma que para el CIC y Si%, se realizó el cálculo de la concentración final de células (CFC) por ml y el porcentaje de supervivencia final (Sf%). Para poder establecer si efectivamente las células extraídas del cartílago esternocostal proliferan en un medio de cultivo bajo las condiciones *in vitro* indicadas por esta investigación; se realizó una comparación entre el CIC y CFC, además se determinó la Tasa de Proliferación (CFC/CIC), donde mayor a 1 indicaba un incremento en la concentración celular luego del cultivo. Así mismo, se comparó el Si% y el Sf% mediante la Tasa de Supervivencia (Si%/Sf%) para establecer en qué medida las células obtenidas a partir de este tipo de cartílago en particular se ven afectadas por las condiciones *in vitro*. Los datos para cada medio de cultivo se muestran en las Tablas 4, 5, 6 y 7.

*Tabla 4: Comparación de CIC y Si% con CFC y Sf%, además de la Tasa de Proliferación (CFC/CIC) de las 24 muestras evaluadas (de C1 a C24) [Medio Basal de Eagle (BME) + 10% Suero Bovino Fetal (SBF)]*

<b>MUESTRA</b>	<b>CIC (cél/ml)</b>	<b>Si%</b>	<b>CFC (cél/ml)</b>	<b>Sf%</b>	<b>Tasa de Proliferación</b>	<b>Tasa de Supervivencia</b>
<b>C1</b>	16050	82,1	90250	80,2	5,6	1,0
<b>C2</b>	19300	91,6	146350	88,7	7,6	1,0
<b>C3</b>	14500	44,5	46500	42,4	3,2	1,0
<b>C4</b>	29400	80,8	164900	83,6	5,6	1,0
<b>C5</b>	20150	51,6	75850	48,5	3,8	1,0
<b>C6</b>	24700	81,5	125600	82,2	5,1	1,0
<b>C7</b>	21600	63,2	69250	56,7	3,2	0,9
<b>C8</b>	21400	61,8	93250	59,3	4,4	1,0
<b>C9</b>	23450	40,1	74100	39,6	3,2	1,0
<b>C10</b>	32900	72,2	102550	70,8	3,1	1,0
<b>C11</b>	22050	79,5	71600	77,4	3,2	1,0
<b>C12</b>	26850	53,5	100450	50,2	3,7	1,0
<b>C13</b>	31850	52,9	96350	50,1	3,0	1,0
<b>C14</b>	17150	83,3	106250	83,6	6,2	1,0
<b>C15</b>	19850	80,9	98400	79,6	4,9	1,0
<b>C16</b>	31250	63,2	103050	64,1	3,3	1,0
<b>C17</b>	25950	81,7	126400	83,4	4,9	1,0
<b>C18</b>	21450	60,4	94100	58,5	4,4	1,0
<b>C19</b>	31500	61,8	94800	59,4	3,0	1,0
<b>C20</b>	29950	94,8	232500	95,9	7,8	1,0
<b>C21</b>	23700	77,5	116550	76,0	4,9	1,0
<b>C22</b>	27250	80,7	145050	82,5	5,3	1,0
<b>C23</b>	18750	79,8	89500	78,3	4,8	1,0
<b>C24</b>	26100	81,3	130100	82,8	4,9	1,0

*Tabla 5: Comparación de CIC y Si% con CFC y Sf%, además de la Tasa de Proliferación (CFC/CIC) de las 24 muestras evaluadas (de C1 a C24) [Medio Basal de Eagle (BME) + 5% Suero Bovino Fetal (SBF)]*

<b>MUESTRA</b>	<b>CIC (cél/ml)</b>	<b>Si%</b>	<b>CFC (cél/ml)</b>	<b>Sf%</b>	<b>Tasa de Proliferación</b>	<b>Tasa de Supervivencia</b>
<b>C1</b>	14150	80,2	9500	82,4	0,7	1,0
<b>C2</b>	18400	90,4	9750	92,2	0,5	1,0
<b>C3</b>	14950	45,5	7300	43,6	0,5	1,0
<b>C4</b>	28950	80,1	10250	79,6	0,4	1,0
<b>C5</b>	20050	52,5	9850	50,3	0,5	1,0
<b>C6</b>	24150	80,9	10100	78,7	0,4	1,0
<b>C7</b>	22250	64,1	7700	52,6	0,3	0,9
<b>C8</b>	20800	61,7	9750	58,3	0,5	1,0
<b>C9</b>	24250	41,3	9950	40,3	0,4	1,0
<b>C10</b>	21950	70,5	10750	68,5	0,5	1,0
<b>C11</b>	21550	79,8	7150	76,5	0,3	1,0
<b>C12</b>	27450	53,9	10500	50,9	0,4	1,0
<b>C13</b>	32250	51,6	10650	50,4	0,3	1,0
<b>C14</b>	16250	82,6	9700	79,9	0,6	1,0
<b>C15</b>	19750	79,2	10150	80,7	0,5	1,0
<b>C16</b>	30650	64,7	10350	62,3	0,3	1,0
<b>C17</b>	25450	81,5	10250	80,2	0,4	1,0
<b>C18</b>	19800	59,9	9900	61,9	0,5	1,0
<b>C19</b>	31400	64,8	8600	61,2	0,3	1,0
<b>C20</b>	28800	95,3	10850	92,5	0,4	1,0
<b>C21</b>	24550	75,9	10300	72,1	0,4	1,0
<b>C22</b>	27550	81,7	10450	80,6	0,4	1,0
<b>C23</b>	18100	81,2	9950	79,7	0,6	1,0
<b>C24</b>	23650	81,4	10400	79,2	0,4	1,0



*Tabla 6: Comparación de CIC y Si% con CFC y Sf%, además de la Tasa de Proliferación (CFC/CIC) de las 24 muestras evaluadas (de C1 a C24) [Medio para cultivo de tejidos-199 (TCM-199) + 10% Suero Bovino Fetal (SBF)]*

<b>MUESTRA</b>	<b>CIC (cél/ml)</b>	<b>Si%</b>	<b>CFC (cél/ml)</b>	<b>Sf%</b>	<b>Tasa de Proliferación</b>	<b>Tasa de Supervivencia</b>
<b>C1</b>	14800	81,4	80300	80,8	5,4	1,0
<b>C2</b>	19150	92,4	104450	90,4	5,5	1,0
<b>C3</b>	15650	44,9	40250	43,0	2,6	1,0
<b>C4</b>	22800	81,6	112700	80,3	4,9	1,0
<b>C5</b>	16400	52,1	69850	50,4	4,3	1,0
<b>C6</b>	25350	81,6	107500	81,3	4,2	1,0
<b>C7</b>	24650	63,6	51750	51,4	2,1	0,9
<b>C8</b>	19250	61,0	70150	59,1	3,6	1,0
<b>C9</b>	23600	40,9	69400	39,7	2,9	1,0
<b>C10</b>	32000	71,6	82050	68,5	2,6	1,0
<b>C11</b>	25550	81,5	49300	80,2	1,9	1,0
<b>C12</b>	28050	53,6	89550	51,9	3,2	1,0
<b>C13</b>	32500	51,9	90050	49,3	2,8	1,0
<b>C14</b>	14450	82,8	86450	79,1	5,9	1,0
<b>C15</b>	20950	80,0	83150	79,6	3,9	1,0
<b>C16</b>	30100	64,7	82600	62,3	2,7	1,0
<b>C17</b>	26500	81,9	97350	82,7	3,7	1,0
<b>C18</b>	23950	59,8	87750	56,5	3,7	1,0
<b>C19</b>	31150	65,0	71900	49,0	2,5	1,0
<b>C20</b>	29000	99,1	173150	96,9	5,9	1,0
<b>C21</b>	20400	77,1	89100	73,5	4,4	1,0
<b>C22</b>	29900	81,6	108500	84,9	3,6	1,0
<b>C23</b>	23150	80,4	77600	76,9	3,4	1,0
<b>C24</b>	27900	81,5	92350	80,6	3,3	1,0

*Tabla 7: Comparación de CIC y Si% con CFC y Sf%, además de la Tasa de Proliferación (CFC/CIC) de las 24 muestras evaluadas (de C1 a C24) [Medio para cultivo de tejidos-199 (TCM-199) + 5% Suero Bovino Fetal (SBF)]*

<b>MUESTRA</b>	<b>CIC (cél/ml)</b>	<b>Si%</b>	<b>CFC (cél/ml)</b>	<b>Sf%</b>	<b>Tasa de Proliferación</b>	<b>Tasa de Supervivencia</b>
<b>C1</b>	16950	80,4	8750	81,4	0,5	1,0
<b>C2</b>	20350	90,7	9050	89,8	0,4	1,0
<b>C3</b>	13750	44,7	7250	42,9	0,5	1,0
<b>C4</b>	28700	80,2	8350	82,7	0,3	1,0
<b>C5</b>	21000	51,9	9100	50,2	0,4	1,0
<b>C6</b>	25700	81,9	9250	80,2	0,4	1,0
<b>C7</b>	19400	63,1	6950	49,9	0,4	0,9
<b>C8</b>	21450	61,9	9100	58,1	0,4	1,0
<b>C9</b>	23050	41,2	9250	39,7	0,4	1,0
<b>C10</b>	32050	71,4	9150	69,5	0,3	1,0
<b>C11</b>	22400	77,8	5900	76,3	0,3	1,0
<b>C12</b>	26950	53,7	8950	50,0	0,3	1,0
<b>C13</b>	32150	52,4	9350	49,7	0,3	1,0
<b>C14</b>	15900	82,2	9150	79,5	0,6	1,0
<b>C15</b>	19550	79,7	9250	79,7	0,5	1,0
<b>C16</b>	30400	63,2	9200	62,1	0,3	1,0
<b>C17</b>	24350	81,6	9000	80,1	0,4	1,0
<b>C18</b>	20650	59,9	8850	56,9	0,4	1,0
<b>C19</b>	30600	63,3	6400	62,1	0,2	1,0
<b>C20</b>	29450	95,0	9450	94,3	0,3	1,0
<b>C21</b>	22550	75,9	9300	73,2	0,4	1,0
<b>C22</b>	26800	80,4	9350	81,8	0,3	1,0
<b>C23</b>	17950	80,9	8850	75,3	0,5	0,9
<b>C24</b>	20750	81,3	9450	80,4	0,5	1,0

### **Proliferación Celular:**

En primer lugar, se observó un incremento en la proliferación celular para este tipo de muestra (cartílago esternocostal) tanto en el medio BME como en el medio TCM-199 con 10% de SBF, respectivamente; sin embargo, por razones externas a la muestra y más bien relacionadas a la concentración de nutrientes y al porcentaje de SBF, también se observó un descenso en la proliferación cuando a ambos medios se les suplementó con 5% de SBF.

Además, al analizar por separado los dos medios de cultivo se observó que para el medio BME + 10%SBF, se presentó un claro aumento de la concentración celular de CIC a CFC y se obtuvo una Tasa de Proliferación mínima de 3,0 y una máxima de 7,8. De la misma forma para el medio TCM-199 + 10%SBF, donde la Tasa de Proliferación mínima fue de 1,9 y la máxima fue de 5,9. Sin embargo, para el medio BME + 5%SBF, la Tasa de Proliferación mínima fue de 0,3 y la máxima fue de 0,7; mientras que para el medio TCM-199 + 5%SBF la Tasa de Proliferación mínima fue de 0,2 y la máxima de 0,6. Esto último implicó una reducción de la concentración celular durante el cultivo *in vitro*, lo cual al comparar entre los diferentes medios, podría ser atribuido a la concentración de SBF. La comparación de la Tasa de Proliferación entre cada una de las muestras para cada medio de cultivo se muestra en la Fig. 6

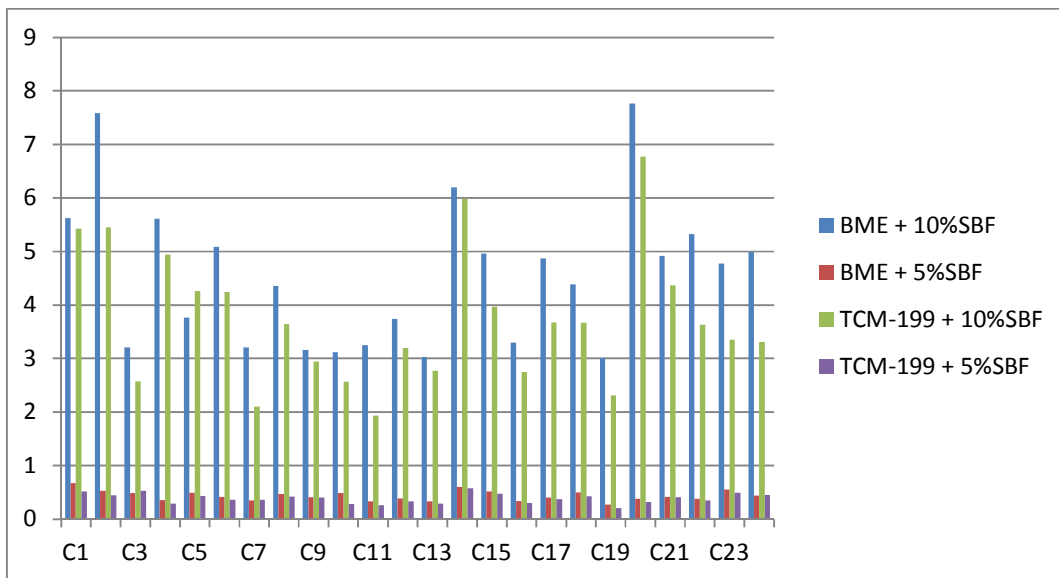


Fig. 6 Comparación de las Tasas de Proliferación para los medios BME+10%SBF, BME + 5%SBF, TCM-199 + 10%SBF y TCM-199 + 5%SBF entre las 24 muestras evaluadas (C1-C24)

En el gráfico anterior, se puede observar que la proliferación celular se incrementó en BME + 10%SBF y TCM-199 + 10%SBF, ya que su tasa de proliferación se encontró por encima de 1; mientras que en el caso de BME + 5%SBF y TCM-199 + 5%SBF, se observó un descenso en la proliferación, ya que la tasa se encontró por debajo de 1. Sin embargo, podemos decir que las células obtenidas del cartílago esternocostal crecieron tanto en el medio BME como TCM-199 suplementados con 10% de SBF, mas no con 5% de SBF.

Además, se realizó el análisis estadístico dentro y entre los medios de cultivo, empleando el programa SPSS 15.0. En el primer caso al evaluar la concentración celular (cél/ml) del medio BME + 10%SBF, se obtuvo un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) del CFC con respecto al CIC; para el medio BME + 5%SBF, se obtuvo un descenso significativo ( $p < 0,05$ ) del CFC con respecto al CIC; para el medio TCM-

199 + 10%SBF, se obtuvo un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) del CFC con respecto al CIC; finalmente, para el medio TCM-199 + 5%SBF, se obtuvo un descenso significativo ( $p < 0,05$ ) del CFC con respecto al CIC.

Así mismo, se empleó la Tasa de Proliferación celular en los dos medios de cultivo con dos concentraciones diferentes de SBF, para realizar una comparación global entre estos mediante una comparación de medias, cuyos resultados se muestran en la Tabla 8.

*Tabla 8: Comparación de las medias de las Tasas de Proliferación entre los medios BME + 10%SBF, BME + 5%SBF, TCM-199 + 10%SBF y TCM-199 + 5%SBF*

MEDIO	TASA DE PROLIFERACIÓN
<b>BME + 10%SBF</b>	4,550 +/- 1,366
<b>BME + 5%SBF</b>	0,438 +/- 0,095
<b>TCM-199 + 10%SBF</b>	3,709 +/- 1,183
<b>TCM-199 + 5%SBF</b>	0,388 +/- 0,093

De la tabla anterior se puede afirmar que para BME + 10%SBF y TCM-199 + 10%SBF, la concentración celular efectivamente aumentó luego de los 10 días de cultivo; sin embargo, el incremento fue mayor en el caso del primer medio. Por otra parte, para los medios de BME + 5%SBF y TCM-199 + 5%SBF, la concentración celular sufrió un descenso luego del cultivo *in vitro*, siendo el de mayor decaimiento este último. Esto podría indicar que el problema en el incremento de la proliferación

no es el medio de cultivo empleado, ya que tanto con BME como TCM-199 se observó crecimiento celular, sino la cantidad de SBF suplementado; en conclusión, se puede afirmar que las células del cartílago esternocostal efectivamente proliferaron en presencia de ambos medios con 10% de SBF, pero en mayor medida cuando el medio fue BME.

Del análisis de varianza (ANOVA) se pudo concluir que al menos uno de los medios con una concentración determinada de SBF difiere significativamente de los otros. Sin embargo, como ANOVA no indica cuantos medios difieren ni cuáles son, se aplicó la prueba de Tukey, de la cual se obtuvo que existieran diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre todos los medios evaluados, excepto entre el BME + 5%SBF y TCM-199 + 5%SBF ( $p > 0,05$ ), es decir, entre estos últimos se podría concluir que la tasa de proliferación no se vio influenciada por estos medios, ya que fue básicamente igual. Entre los medios BME+10%SBF y TCM-199 + 10%SBF, se obtuvo un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) en la tasa de proliferación del primero con respecto al último. Sin embargo, para observar de una mejor manera las diferencias entre los medios con diferentes concentraciones de SBF, se realizó un diagrama de cajas comparando las medias de las tasas de proliferación entre cada uno de estos (Fig. 7)

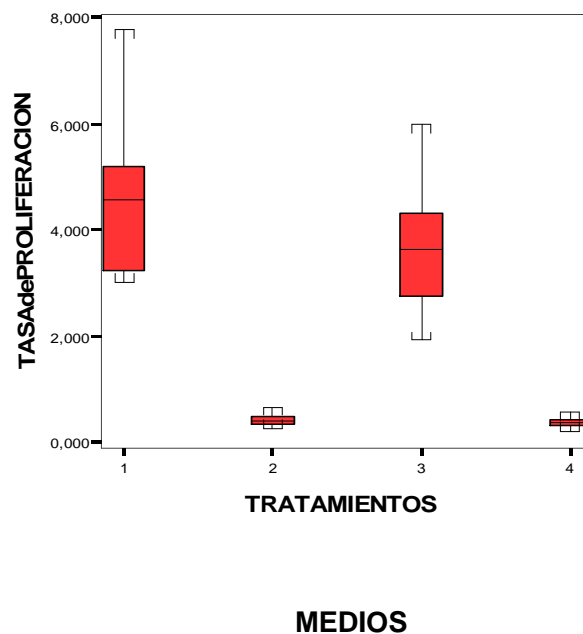


Fig. 7 Comparación de las medias de las Tasas de Proliferación obtenidas con los medios BME + 10%SBF (1), BME + 5%SBF (2), TCM-199 + 10%SBF (3) y TCM-199 + 5%SBF (4)

En el gráfico anterior se puede observar que el medio 1 (BME+10%SBF) es el que alcanzó una mayor tasa de proliferación con respecto a los demás, lo cual confirma lo concluido mediante el análisis estadístico explicado anteriormente. Seguido por el medio 3 (TCM-199 + 10%SBF), el medio 2 (BME + 5%SBF) y el medio 4 (TCM-199 + 5%SBF), en orden descendente.

### Supervivencia Celular:

Se observó un claro descenso en la supervivencia celular para este tipo de muestra (cartílago esternocostal) luego de los 10 días de cultivo con los diferentes medios. Sin embargo, los cultivos en BME + 10%SBF, BME + 5%SBF, TCM + 10%SBF y TCM-199 + 5%SBF presentaron algunas muestras que superaban su Si% luego del periodo del cultivo; además se observó que la Tasa de Supervivencia mínima en todos los medios de cultivo fue de 0,9 y la Tasa de Supervivencia máxima fue 1. La comparación de la Tasa de Supervivencia entre cada una de las muestras para cada medio se muestra en la Fig. 8

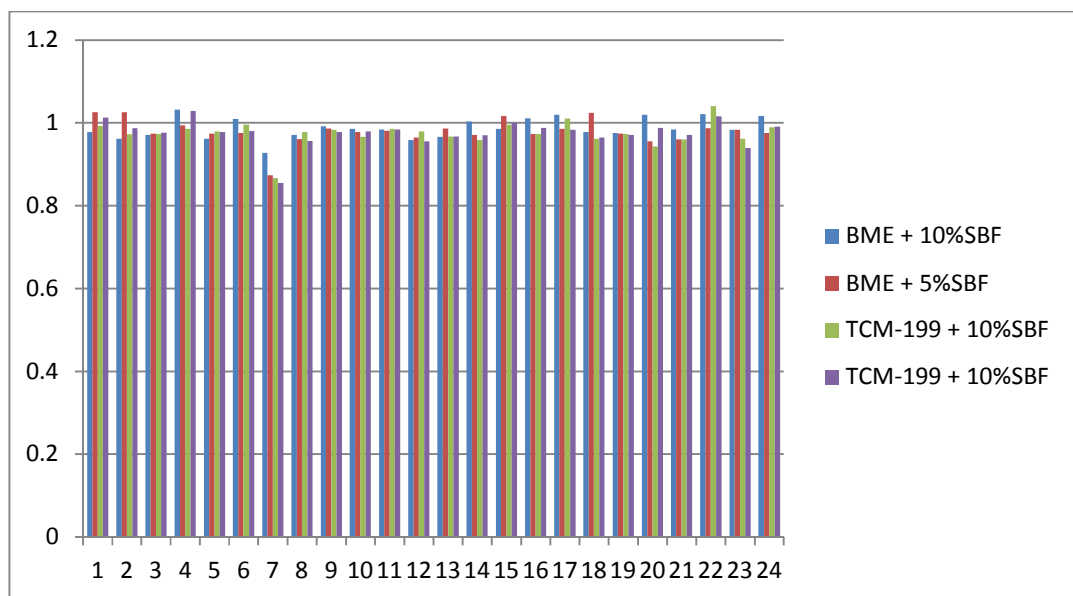


Fig. 8 Comparación de las Tasas de Supervivencia para los medios BME+10%SBF, BME + 5%SBF, TCM-199 + 10%SBF y TCM-199 + 5%SBF entre las 24 muestras evaluadas (C1-C24)



En el gráfico anterior se puede observar que entre las muestras, existió una baja tasa de supervivencia, por debajo de 1, cuya excepción son en su mayoría algunas muestras cultivadas en medio BME + 10%SBF y BME + 5%SBF. Además, se observó que la muestra C7 presenta problemas al ser la que presenta la menor tasa de supervivencia entre todas en los diferentes medios.

Se realizó el análisis estadístico dentro y entre medios, para lo cual se aplicó la función arcoseno a los porcentajes de supervivencia tanto inicial como final, como se explicó en la metodología, para obtener un valor representativo de la Tasa de Supervivencia celular. Dentro de los medios, al evaluar la supervivencia celular de BME+10%SBF, BME + 5%SBF, TCM-199 + 10%SBF y TCM-199 + 5%SBF, se obtuvo un descenso significativo ( $p < 0,05$ ) del Sf% con respecto al Si%, en todos los medios.

De igual forma, empleando la Tasa de Supervivencia para cada una de las muestras evaluadas en los cuatro medios se realizó una comparación global entre estos mediante una comparación de medias, cuyos resultados se muestran en la Tabla 9.

*Tabla 9: Comparación de las medias de las Tasas de Supervivencia entre medios evaluados*

MEDIO	TASA DE SUPERVIVENCIA
<b>BME+10%SBF</b>	0.987 +/- 0.025
<b>BME + 5%SBF</b>	0.979 +/- 0.030
<b>TCM-199 + 10%SBF</b>	0.975 +/- 0.030
<b>TCM-199 + 5%SBF</b>	0.976 +/- 0.032

De la tabla anterior se puede afirmar que en ningún caso las tasas de supervivencia superaron el valor de 1. Sin embargo, se observó que BME+10%SBF y BME+5%SBF, presentaron las mayores tasas de supervivencia celular, mientras que para TCM-199+10%SBF y TCM-199+5%SBF las tasas de supervivencia fueron menores y relativamente parecidas.

Del análisis de varianza (ANOVA) se pudo concluir que no existieron diferencias significativas entre los medios ( $p > 0,05$ ), es decir todos los cultivos fueron afectados por igual con las condiciones *in vitro*; donde la tasa de supervivencia en promedio para todos fue menor a 1. Sin embargo, para observar de una mejor manera el panorama de la supervivencia celular en los medios con diferentes concentraciones de SBF, se realizó un diagrama de cajas comparando las medias de las tasas de supervivencia entre cada uno de estos (Fig. 9)

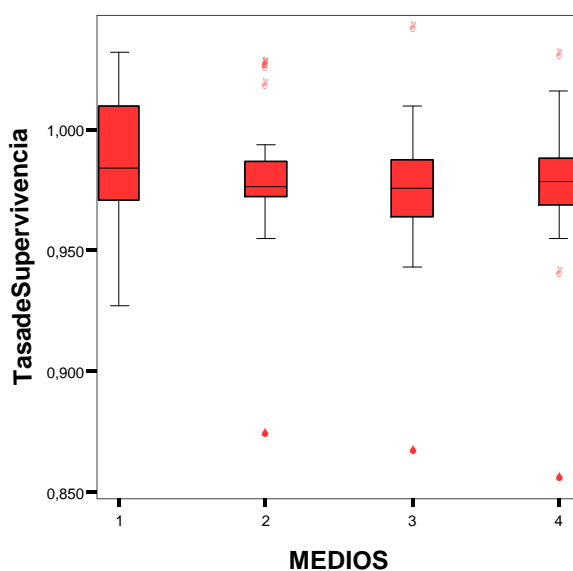


Fig. 9 Comparación de las Tasas de Supervivencia de los cuatro medios evaluados mediante el diagrama de cajas

Como se puede observar, las tasas de supervivencia entre los cuatro medios evaluados no presentaron diferencias significativas; no obstante, se puede observar que las medias en todos los casos se encontraron por debajo de 1, con lo cual se puede afirmar que la supervivencia de las células post-cultivo si se vio afectada. Además, existieron 4 muestras [1 (C7) en BME+5%SBF; 1 (C7) en TCM-199+10%SBF y 2 (C7 y C23) TCM-199+5%SBF], que escaparon en el análisis y se ubicaron por debajo de 1, éstas representan a aquellas que mostraron un mayor descenso en cuanto a la supervivencia celular post-cultivo. Sin embargo, también existieron muestras que se ubicaron por encima de 1, solo en el caso de BME + 10% SBF se puede afirmar que es el único medio en el cual las células proliferaron elevando a su vez su supervivencia. No obstante, en los demás medios se observaron algunas muestras que se encuentran muy superiores al umbral establecido para cada uno de estos [3 (C1, C2 y C15) en BME+5%SBF; 1 (C22) en TCM-199+10%SBF y 1 (C4) TCM-199+5%SBF].

## VI. DISCUSIÓN

---

En esta tesis hemos realizado un primer estudio sobre la posibilidad de obtención de un cultivo primario empleando una nueva zona de extracción de cartílago hialino articular (cartílago esternocostal) de *Equus caballus*, con el fin de aportar con una nueva alternativa para el aislamiento de condrocitos que puedan ser utilizados luego en terapia celular.

Para esta investigación se decidió trabajar con muestras pequeñas, que en este caso oscilaron entre 0,0398 y 0,0878 gramos, a comparación con las trabajadas por Lombello et al., 2003; quienes emplearon muestras de cartílago articular humano de entre 0,102 y 0,417 gramos (media de peso = 0,255 gramos). Esto debido a que al tratarse de un tipo de cultivo nuevo, es decir obtenido por primera vez a partir de cartílago esternocostal de *Equus caballus*, al ser la muestra de un mayor tamaño y al no saber cómo reaccionará ante las condiciones del cultivo, se corre el riesgo de encontrar más problemas durante el protocolo, como la presencia de contaminación, porque una elevada cantidad de células acarrea consigo sus propios agentes contaminantes; no olvidar que es un tejido recién extraído de un animal, del cual no se

conoce con certeza su historial clínico. Además, la falta de proliferación y la disminución de la supervivencia celular, pueden también ser otras consecuencias, ya que no se conoce el umbral de células de este tipo (condrocitos) que pueden crecer en una determinada cantidad de medio, para esto debemos tener en cuenta que si sembramos una cantidad elevada de células, por ejemplo en 3 ml de medio de cultivo (como se realizó en esta tesis), no se puede asegurar que éstas proliferen adecuadamente o sobrevivan, porque aún no se conoce, la cantidad de nutrientes del medio que serán suficientes como para satisfacer las necesidades de las células.

Para el aislamiento de condrocitos a partir de las muestras de cartílago esternocostal de *Equus caballus*, el uso de la técnica de cuchillas cruzadas descrita por Freshney (2005), parece no ser la más adecuada, ya que solo se logró disociar un 80% de la muestra; por lo que las técnicas de disociación mecánicas no deben aplicarse solas, sino en conjunto con técnicas de disociación enzimáticas, como las empleadas en este trabajo con solución de tripsina 0.05% y soluciones de collagenasa 0.2% y 0.04%. No obstante, durante la revisión bibliográfica no se logró encontrar alguna técnica mecánica lo suficientemente eficaz para disgregar este tipo de tejido, por ejemplo Freshney (2005) también propone el uso del tamizado o el pipeteo fuerte para la disgregación de tejido, pero a nuestro parecer estas otras técnicas solo funcionarían para tejidos blandos más no para cartílago. Sin embargo, otros autores afirman que solo es necesario realizar cortes delgados del cartílago y luego aplicar simplemente el tratamiento enzimático para poder aislar las células; por ejemplo Esfandiary et al., 2008 emplearon pequeñas piezas de cartílago rotuliano de 50 pacientes, las cuales fueron lavadas en medio Ham's – F12 y seguidamente tratadas primero con pronasa 1% por 2 horas a 37 °C y luego con collagenasa 0.2% por 4 horas a 37 °C; Yen et al., 2008 emplearon collagenasa 0.6% y hialuronidasa 0.6% por 24 horas a 37 °C, para

aislar células del cartílago de rodillas cerdos adultos; además, Milner et al., 2006 emplearon piezas de cartílago de articulaciones del espolón (metacarpofalangeal) de caballos sacrificados, los condrocitos fueron aislados en DMEN (osmolaridad de 290 mOsm/kg) mediante digestión con colagenasa (0.8-1.0 mg/ml) por 15 horas. Ante este panorama presentado, sería importante probar con otras técnicas de disgregación enzimática, como pronasa y hialuronidasa, adicionales a las empleadas en las metodologías clásicas para el aislamiento de células a partir de cartílago. En este trabajo se emplearon las soluciones de tripsina y colagenasa debido a que en la mayoría de trabajos realizados con cartílago articular rotuliano de *Equus caballus* se utilizaron estas soluciones enzimáticas obteniendo buenos resultados; además, previo a la realización de este trabajo se realizó una estandarización de la metodología sobretodo en cuanto a las concentraciones de las soluciones enzimáticas y a los tiempos de incubación con estas, ya que, en la bibliografía muchos autores diferían en estos factores, por lo cual fue necesario probar entre todas las metodologías indicadas por ellos hasta encontrar aquella con la cual se observó una mejor tasa de proliferación y supervivencia; finalmente, se obtuvo la metodología empleada en esta investigación.

El número de células obtenidas de determinada cantidad de muestra en esta tesis fue en promedio de 23 690 condrocitos en 0,0589 gramos de cartílago articular esternocostal de caballo, lo cual no fue cercanamente proporcional a los valores obtenidos por Lombello et al., 2003; quienes de 0,1 gramos de tejido cartilaginoso articular humano obtuvieron 140 560 condrocitos; sin embargo, esto se debe a que nuestra concentración inicial fue tomada luego de un protocolo de aislamiento complejo consistente de dos lavados consecutivos entre el cambio de soluciones enzimáticas, durante los cuales se presume la pérdida de un porcentaje de células.

Por otra parte, el protocolo de aislamiento de células empleado por estos autores fue más simple, consistiendo en un solo lavado con PBS luego de la digestión del tejido con pronasa y colagenasa, por lo cual se podría decir que en su caso la posibilidad de pérdida de células era mínima. En nuestro caso, se buscó encontrar un protocolo más simple que disminuya la posibilidad de pérdida de células durante el aislamiento; sin embargo, debido a la bibliografía revisada y a la propia experiencia con este tipo de muestra durante la estandarización de la metodología, podemos decir que los consecutivos lavados entre las soluciones de tripsina y colagenasa fueron necesarios para inhibir la acción de la enzima anterior sobre el tejido antes de pasar a la siguiente; sin embargo, ante esto recomendamos la búsqueda de algún otro tipo agente de disgregación que sea más efectivo para el aislamiento de células de este tipo de tejido, a fin de evitar en lo posible la pérdida celular.

Cuando se inició esta investigación, la mayor preocupación con respecto a ésta fue efectivamente como iniciarla, ya que se empezó desde cero con una muestra nunca antes utilizada en otras investigaciones para *Equus caballus*, por lo que de alguna manera fue necesario estandarizar el protocolo de obtención del cultivo, para lo cual nos basamos en diversas metodologías de muchos autores, cuya compilación dio como resultado la metodología empleada en este trabajo, que a nuestro parecer fue la más adecuada a utilizar, pero que sin embargo durante la investigación nos dimos cuenta de que se puede mejorar en ciertas partes. El periodo del cultivo surgió tomando como referencia la tesis doctoral de Fernández, 2006; ya que su trabajo fue el que en su mayor parte se parecía a lo que se iba a realizar en esta investigación; empleando condrocitos de la línea celular humana C-28/12 estableció las condiciones óptimas de cultivo encontrando que dichas células se mantenían estables desde el día 10 hasta el 13 en que aumenta la muerte celular con la consiguiente disminución de

células; mientras que para el caso de los cultivos primarios de condrocitos humanos procedentes de cartílago de epífisis fetal se mantenían en fase de latencia los 4 primeros días, durante los cuales tuvo lugar la recuperación del cultivo, produciéndose una pérdida del número de células el día 1 respecto a las células que se sembraron. A partir del día 5, el cultivo entró en fase de crecimiento exponencial produciéndose un incremento del número de células hasta llegar al día 10, en el cual alcanzó el número máximo. Así mismo, encontró que el cultivo llegó a la fase de confluencia el día 10. Inicialmente sembró 3000 cél/cm<sup>2</sup> y dejó crecer durante 10 días en medio DMEN/HAM-F12 (1/1, v/v) suplementado con 10% de SBF a 37 °C, con 5% de CO<sub>2</sub> y 5% de humedad, para que las células estuvieran en fase exponencial tardía y así obtener una cantidad suficiente de RNA para poder realizar sus análisis moleculares de expresión de genes de este tipo de células. Para confirmar si también se obtenían resultados parecidos a los de ella, en los que nos pudiésemos basar para iniciar nuestra investigación, se decidió realizar un pre-ensayo (resultados no mostrados) para el cual se utilizó el modelo clásico de laboratorio *Mus musculus* (macho adulto), a partir de cuya xifoides se extrajeron las células condrales que fueron sembradas en el medio BME + 20%SBF, BME + 15%SBF, BME + 10%SBF y BME + 5%SBF y cultivadas por 10 días a 37 °C, con 5% de CO<sub>2</sub> y 5% de humedad. Durante ese tiempo la curva de proliferación llegó a su pico más alto y se mantuvo en una fase estable durante los siguientes 4 días solo para los casos de BME + 10%SBF y BME + 5%SBF, mientras que para BME + 20%SBF y BME + 15%SBF a los 10 días la curva aún se encontraba en su fase exponencial por lo que se decidió continuar observando este cultivo y fue hasta el día 14 en el que llegó a su pico de proliferación más alto. Tanto para el primer grupo (BME + 10%SBF y BME + 5%SBF) como para el segundo (BME + 20%SBF y BME + 15%SBF) a los 10 y 14 días, respectivamente, en que se dio el pico más alto de proliferación, la concentración final de células fue cercana; a pesar,



de no ser el modelo a utilizar en esta investigación se decidió emplear el periodo de 10 días para finalizar el cultivo, como lo realizó Fernández, 2006 y empleando BME + 10%SBF y BME + 5%SBF, ya que fueron los medios en los cuales el cultivo proliferó a los 10 días como se esperaba; no se empleó BME + 20%SBF y BME + 15%SBF, debido a que el crecimiento celular en estos medios fue muy parecido al obtenido con los dos medios mencionados anteriormente e implicaba un periodo de tiempo de cultivo mayor en 4 días. Además, luego de establecer el periodo de cultivo de 10 días y aplicarlo a las muestras de cartílago esternocostal de *Equus caballus*, en las primeras muestras se observó el mismo patrón de curva de proliferación, es decir, a los 10 días alcanzó el mayor número de células mientras que para el día 15 se observó una clara disminución de estas.

Además, comparando nuestros resultados con los obtenidos por Pruksakorn et al., 2009; quienes realizaron un estudio empleando condrocitos aislados a partir de cartílago articular humano sin osteoartritis utilizando tripsina y colagenasa para la digestión del tejido y cultivando las células en monocapa en DMEN suplementado con 10% de suero fetal de ternero y antibióticos a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> y 5% de humedad; podemos encontrar que ellos trabajaron con una suspensión celular de 1500 µl que contenía  $3 \times 10^5$  células, la cual fue cargada a cada andamio que utilizaron para la realización del cultivo. Para la evaluación de la proliferación celular emplearon el ensayo Alarmblue, en el cual se incorpora un indicador de crecimiento fluorométrico/colorométrico basado en la reacción oxido-reducción (REDOX), el cual responde a la reducción química del medio de crecimiento resultante de la proliferación celular. Sus resultados muestran que para el día 0, el cultivo que se realizó solo en el andamio sin añadir ácido hialurónico, presentó aproximadamente 25% de reducción de AlarmBlue, mientras que para el día 7 presentó 40%, para el día 14 presentó 35% y para el día 21 presentó 15% aproximadamente; según las

indicaciones del manual de Invitrogen para este producto, los porcentajes de reducción equivalen en cierta forma al porcentaje de proliferación celular, es decir, a mayor % de reducción del AlarmBlue, mayor crecimiento celular. Entonces, de acuerdo a la curva que describe estos resultados se puede observar que entre el día 7 y 14 se da la fase de platea en el crecimiento celular, a pesar que la concentración celular máxima fue obtenida el día 7, en nuestra investigación decidimos optar por el día 10 como el día de fin del cultivo, por los resultados obtenidos por Fernández, 2006 descritos anteriormente, ya que su trabajo se acerca más a los objetivos del nuestro. Sin embargo, los resultados de Pruksakorn et al. también marcaron gran importancia en la realización de este trabajo, ya que ellos muestran un patrón de descenso en el crecimiento celular pasado el día 14, presentando una fase de decaimiento donde las células sufren apoptosis, siendo los días continuos a este no aceptables para realizar el conteo final de células. Con este trabajo una vez más podemos observar que el tiempo establecido en esta tesis para la finalización del cultivo (10 días) es el adecuado, debido a que la proliferación celular se encuentra al máximo y por tanto se espera que las células expresen genes, como el colágeno tipo II, en un mayor porcentaje.

El cambio de medio de cultivo luego de su inicio fue a los 4 días, para permitir que las células sedimenten y se adhieran a la placa; luego el cambio fue realizado cada 3 días, esto se realizó según las recomendaciones de Almonte-Becerril y Kouri, 2006, quienes realizaron un cultivo de condrocitos obtenidos de 50 pacientes con operaciones de rodilla y cadera, y renovaron el medio cada 3 días. Al inicio de nuestra investigación se pensó realizar el cambio de medio cada 3 días como lo indicaban los autores; sin embargo, al realizar el primer cambio en ese periodo se observó una pérdida de células en el lavado, por lo cual se decidió probar con 4 días, tiempo en el

cual al realizar el cambio aún se observó pérdida celular pero esta no fue significativa, además dicho cambio no podía esperar un día más por temor a que las células sufran estrés por pérdida de nutrientes. Además, en el trabajo de Lombello et al., 2003 podemos observar que ellos realizaban el cambio de medio 2 a 3 veces por semana, es decir cada 3 o 4 días casi como en nuestro trabajo.

Por estudios previos se sabe que los condrocitos tienen una capacidad muy limitada de proliferación debido a que son células altamente diferenciadas, lo que limita la reparación del cartílago al padecer OA; además los condrocitos de individuos con OA adquieren características fenotípicas diferentes a los condrocitos normales, lo que produce un cartílago débil que aumenta la lesión (Almonte-Becerril y Kouri, 2006). Un condrocito maduro es grande, oval y forma grupos isógenos (agrupación de 4-8 condrocitos en una matriz territorial común provenientes de la división y diferenciación de un único condrocito mediante mitosis durante su proliferación). Tanto al inicio del cultivo como luego de los 10 días de cultivo, efectivamente las células presentaron características representativas de un condrocito maduro, como su redondez; y de proliferación, como la formación de colonias de células, denominadas grupos isógenos.

Dentro de la revisión bibliográfica, encontramos que el medio mayormente utilizado para el cultivo de condrocitos era el Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM); sin embargo, al no contar con este medio y al ser ésta una investigación inicial, se decidió emplear dos tipos de medios diferentes (BME, un medio basal y TCM-199, un medio complejo) suplementados con dos concentraciones de SBF (10 y 5%), con el fin de poder evaluar la evolución del cultivo desde su forma básica (en un medio con los nutrientes justos para la proliferación y supervivencia celular) hasta su forma más compleja (en un medio con los nutrientes específicos para determinados tipos de

tejidos); sin embargo, hubiese sido ideal la utilización del DMEN en lugar del TCM-199, ya que como se observa en las Tabla 10, 11 y 12 (anexo) la composición de ambos medios e incluso en comparación también con el BEM, difieren tanto en aminoácidos, sales inorgánicas, vitaminas y otros componentes, así como en la concentración de estos, lo cual los hace medios específicos de ciertos tipos de líneas celulares, de acuerdo a las necesidades de estas. Sin embargo, para ser esta una investigación inicial por el tipo de muestra se puede considerar la utilización de estos tipos de medios para un primer estudio y estandarización de la metodología.

Nuestros resultados para la proliferación celular, presentan un incremento de la concentración celular luego de los 10 días de cultivo, para los medios BME + 10%SBF y TCM-199 + 10%SBF, con tasas de proliferación de  $4,550 \pm 1,366$  y  $3,709 \pm 1,183$  respectivamente; mientras que hay un decaimiento de la concentración celular en los medios BME + 5%SBF y TCM-199 + 5%SBF, con tasas de proliferación de  $0,438 \pm 0,098$  y  $0,388 \pm 0,093$  respectivamente (ver resultados, Tabla 8). Sin embargo, entre todos los medios evaluados, luego de los análisis estadísticos, podemos afirmar que el BME + 10%SBF es el que permite en mayor medida la proliferación celular.

Yen et al., 2008; cultivaron condrocitos extraídos del cartílago articular rotuliano de cerdos adultos de 8 a 12 meses de edad, en esponjas de alginato en medio DMEN con 10% SBF, 1% de antibiótico-antimicótico y 1% de piruvato de sodio; sembrándolos a diferentes densidades: baja ( $5 \times 10^5$  células por 40 esponjas), media ( $5 \times 10^6$  células por 40 esponjas) y alta ( $2 \times 10^7$  células por 40 esponjas), de las cuales todas presentaron buena proliferación celular. Al evaluar en la semana 4 los grupos de media y alta densidad alcanzaron  $4.7 \pm 0.7 \times 10^7$  y  $6.1 \pm 0.4 \times 10^7$  células por 40 esponjas, respectivamente. El grupo de baja densidad alcanzo rápidamente  $2.4 \pm 1.0 \times 10^6$  y  $1.2 \pm 0.3 \times 10^7$  células por 40 esponjas en la semana 1 y 2, respectivamente, y alcanzo  $3.0 \pm 0.9 \times 10^7$  células por 40 esponjas en la semana 4. Calculando la tasa

de proliferación para estos tres grupos se obtuvo que para el de baja densidad fue de 60 aproximadamente, mientras que para los de mediana y alta densidad fue de 10 y 3 aprox., respectivamente. Además, considerando como concentración inicial de células solo a aquellas que se adhirieron eficientemente a las esponjas (baja:  $2.1 \pm 0.2 \times 10^5$ , media:  $2.3 \pm 0.4 \times 10^6$ , y alta:  $1.3 \pm 0.1 \times 10^7$  células adheridas eficientemente a 40 esponjas) y a partir de las cuales se calcularán las tasa de proliferación para cada uno de los grupos evaluados, con respecto a la concentración final de células en la semana 4, el grupo de baja densidad alcanzo una tasa de aproximadamente 60 veces en 2 semanas y una tasa de expansión final de 150 veces aproximadamente en la semana 4, lo cual excedió de lejos a aquellas alcanzadas por los grupos de mediana (21 veces aproximadamente) y alta (4.7 veces aproximadamente) densidad. De estos resultados podemos observar que partiendo de una concentración inicial de células sembradas, sin considerar solo a aquellas que se adhirieron al soporte (ya que en nuestro estudio se busca comparar la concentración inicial y final de células a fin de comparar las tasas de proliferación del cultivo, mas no el tipo de soporte empleado para el cultivo como las esponjas de alginato), la que mayor tasa de proliferación obtuvo fue el grupo de menor densidad con un valor de 4 en la semana 1, de 20 en la semana 2 y de 60 en la semana 4; y comparando con nuestros resultados de cultivo en medio BME + 10%SBF podemos observar que la tasa de proliferación es muy cercana a la obtenida por Yen et al. en la semana 1, ya que en nuestro caso a los 10 días de cultivo su valor fue de  $4,550 \pm 1,366$ . Además, considerando la diferencia de los medios de cultivo (DMEN empleado por Yen et al. y BME empleado en este trabajo) podemos decir que la proliferación celular no se ve realmente afectada por esta, esto puede deberse a que al ser un medio básico y en el que se basó el DMEN, empleado por muchos autores con excelentes resultados, fue ante el que mejor reaccionó este tipo de cultivo por contener, tal vez, no todos los nutrientes necesarios

para la obtención de un cultivo exitoso, pero si los suficientes como para se dé el crecimiento celular. Además, podemos decir que la utilización del BME en este trabajo, como primer estudio en el cultivo de condrocitos extraídos a partir de cartílago esternocostal de caballos y para la estandarización de la metodología, ofrece resultados cercanamente similares a los esperados a obtener con DMEN, un medio específico para el cultivo de células condrales; por lo cual, su utilización en esta tesis ha ofrecido resultados que en su posterioridad podrían ser empleados como punto inicial a partir del cual se puedan realizar investigaciones más específicas en cuanto al cultivo de estas células empleando DMEN; cabe recalcar que este trabajo es solo un primer estudio en el cual se buscó probar que era posible obtener un cultivo primario de esta línea celular de caballo empleando cartílago esternocostal.

Además, Egerbacher et al., 2001 sembraron condrocitos aislados de cartílago articular de un caballo (de 2 años, hembra) y de un perro (de 17 semanas, hembra), empleando soluciones de tripsina 0.05% y colagenasa 0.2%, en un medio control compuesto por DMEN y HAM's F12 (1:1) suplementado con 10% de suero fetal de ternero, L-glutamina (365 mg/l), antibióticos y antimicóticos; a una concentración de  $10^6$  cél/placa (cada placa con 4ml de suspensión celular, por tanto a una concentración de 250000 cél/ml). Luego de 5 días de cultivo, éste proliferó hasta aproximadamente 850000 cél/ml, es decir, tuvo una tasa de proliferación de 3.4, la cual se acerca a la obtenida por nosotros con TCM-199 + 10%SBF (3,709 +/- 1,183); sin embargo, ante estos resultados podemos afirmar que BME + 10%SBF sigue siendo el medio con el que este tipo de células (condrocitos) presentan una mayor tasa de proliferación celular, de 4,550 +/- 1,366, y por lo tanto es el que mayores ventajas presentaría para el establecimiento de una línea celular. El porcentaje de Proliferación Celular evaluado mediante tinción inmunohistoquímica con Ki67 (clone MIB5, dilución 1:50; Immunotech, France) obtenida por los autores fue de 70%

aproximadamente; comparando estos resultados con los obtenidos en esta tesis para los medios que mejor tasa de proliferación alcanzaron, BME + 10%SBF y TCM-199 + 10%SBF, tenemos que para el primero la proliferación celular aumentó de un promedio 24046 cél/ml a 108071 cél/ml aproximadamente, es decir en un 77.75%; mientras que para el segundo aumentó de un promedio 24050 cél/ml a 86133 cél/ml aproximadamente, es decir en un 72.08%. Esto se acerca a los resultados obtenidos por los autores, superándolos en nuestro caso; sin embargo, al no haberse empleado la misma metodología para la determinación de la proliferación celular solo podemos decir que ésta se incrementó proporcionalmente en ambos trabajos, por tanto en esta tesis podemos decir que la proliferación celular fue un éxito comparada con los resultados de autores como este y Yen et al.

Del mismo modo Lombello et al., 2003 realizaron un cultivo de condrocitos de cartílago articular obtenido de 6 hombres y 3 mujeres (de 23-66 años), de dichas muestras se obtuvieron 11 cultivos en medio HAMF12 suplementado con 1% de antibiótico, 10% de SBF que se mantuvieron por periodos de hasta 40 días. De este trabajo se obtuvo una concentración final promedio de células de 8 500 000 cél/ml, es decir, un aumento de 23.7 veces en el número de células.

Existen otro tipo de investigaciones, en las cuales se utilizan innovaciones biotecnológicas como la obtención de cultivos celulares empleando andamios sobre los cuales las células tienden a crecer, tal es el caso de Yen et al., 2008; quienes cultivaron condrocitos extraídos del cartílago articular rotuliano de cerdos adultos de 8 a 12 meses de edad, en esponjas de alginato en medio DMEN con 10% SBF, 1% de antibiótico-antimicótico y 1% de piruvato de sodio; sembrándolos a diferentes densidades: baja ( $5 \times 10^5$  células por 40 esponjas), media ( $5 \times 10^6$  células por 40 esponjas) y alta ( $2 \times 10^7$  células por 40 esponjas), de las cuales todas presentaron buena proliferación celular. De las células sembradas en diferentes densidades solo

una parte se adhirieron eficientemente a las esponjas: baja:  $2.1 \pm 0.2 \times 10^5$ , media:  $2.3 \pm 0.4 \times 10^6$ , y alta:  $1.3 \pm 0.1 \times 10^7$  células adheridas a 40 esponjas; estas cantidades serán consideradas como el número de células iniciales a partir de las cuales se harán los cálculos de la tasa de proliferación celular. Entonces, al evaluar en la semana 4 los grupos de media y alta densidad alcanzaron  $4.7 \pm 0.7 \times 10^7$  y  $6.1 \pm 0.4 \times 10^7$  células por 40 esponjas, respectivamente. El grupo de baja densidad alcanzó rápidamente  $2.4 \pm 1.0 \times 10^6$  y  $1.2 \pm 0.3 \times 10^7$  células por 40 esponjas en la semana 1 y 2, respectivamente, y alcanzó  $3.0 \pm 0.9 \times 10^7$  células por 40 esponjas en la semana 4. Basados en la densidad de las células que se adhirieron eficientemente a las esponjas (baja:  $2.1 \pm 0.2 \times 10^5$ , media:  $2.3 \pm 0.4 \times 10^6$ , y alta:  $1.3 \pm 0.1 \times 10^7$  células adheridas a 40 esponjas) y la densidad dependiente del tiempo, el grupo de baja densidad alcanzó una tasa de expansión de aproximadamente 60 veces en 2 semanas y una tasa de expansión final de 150 veces aproximadamente en la semana 4, lo cual excedió de lejos a aquellas alcanzadas por los grupos de mediana (21 veces aproximadamente) y alta (4.7 veces aproximadamente) densidad en este mismo periodo de tiempo. De estos resultados los autores concluyeron que en los tres casos existió buena proliferación celular, lo cual es importante ya que como ellos afirman procurar un número suficiente de condrocitos es de gran interés la ingeniería del tejido cartilaginoso. En su trabajo además comparan otras opciones biotecnológicas para el cultivo de condrocitos y afirman que aunque la amplificación *in vitro* de estas células en monocapa da lugar a una tasa de expansión de aproximadamente 4000 veces en 4 semanas en 7 traspases, lo cual supera en gran medida la mayor tasa de proliferación obtenida por ellos de aprox. 150 veces en el grupo de baja densidad en el mismo periodo de tiempo, el traspase en monocapa permite la desdiferenciación celular y últimamente una calidad inferior del cartílago. Sin embargo, para superar la desdiferenciación celular se pudo realizar el traspase de condrocitos sobre superficies



recubiertas con Col II o Col I, pero este tipo de traspase solo permite una expansión menor a 10 veces. Del mismo modo, cultivar los condrocitos en perlas de alginato, poros PLGA, PGA, condroitin-6-sulfato/dermatán sulfato/quitosan, soporte híbrido alginato/alcohol polivinílico o soportes alginato/quitosan solo resultan en grados limitados de expansión menores de 10 veces. Por tanto ante estos resultados, los autores concluyeron que sembrar condrocitos en esponjas de alginato a una alta densidad permitió un bajo grado de expansión y dio constructos de tejido tipo cartílago; y en contraste, sembrar este tipo de células a baja densidad permitió una tasa de expansión mucho mayor (aprox. 150 veces) en 4 semanas sin la necesidad de traspases y representa un dramático mejoramiento en la expansión de condrocitos autólogos. Comparando nuestro trabajo con el de los autores, se puede decir que en nuestro caso el cultivo fue sembrado a una baja densidad (en un promedio 23690 cél/ml) y que a los 10 días la mejor tasa de proliferación fue de 4,550 +/- 1,366 en BME + 10% SBF, lo cual es mucho menor a la obtenida por ellos en dos semanas de aproximadamente 60, esto nos lleva a concluir que el uso de algún tipo de soporte, especialmente las esponjas de alginato, sería favorable en el cultivo de condrocitos, junto con la no utilización de traspases durante el establecimiento del cultivo, ya que permite una mejor tasa de proliferación celular. Además, el uso de una baja densidad de células para iniciar el cultivo es lo más recomendable, debido a como se ha visto en el trabajo de Yen et al., esto también permitió que la tasa de proliferación sea mucho mayor.

A pesar de no utilizar el DMEN en el cultivo, pudimos obtener buenos resultados, más no los esperados, con BME + 10 %SBF, seguido por el TCM-199 + 10%SBF; con lo cual podemos esperar que un cultivo con éste sea más que exitoso, ya que con esto comprobamos que este tipo de células es lo suficientemente resistente a la falta de nutrientes específicos, pudiendo proliferar tan solo con los nutrientes básicos, pero

que ante la presencia de nutrientes específicos para este tipo celular proliferaría mejor. En este trabajo, el hecho de que del cultivo en BME se obtuvo una mayor cantidad de células que de TCM-199, puede deberse también a que este último es específico para otros tipos de tejidos.

Nuestra tasa de supervivencia celular no fue buena, siendo con todos los medios evaluados menor a 1, siendo la más cercana a este la obtenida con BME +10% SBF con  $0,987 \pm 0,025$ ; sin embargo, de acuerdo a los análisis estadísticos utilizados se pudo concluir que no existían diferencias significativas entre los medios de cultivo ( $p > 0,05$ ), es decir, todos los cultivos en los diferentes medios fueron afectados por igual por las condiciones *in vitro*. No obstante, las tasas de proliferación celular obtenidas en este trabajo nos hacen dudar con respecto a que si solo fueron las condiciones *in vitro* las causantes del descenso de la supervivencia celular, ya que si fuese así, entonces desde el inicio del cultivo la proliferación celular se hubiese visto truncada. Por tanto, cabe suponer que no fueron en su totalidad dichas condiciones las que condicionaron la supervivencia celular del cultivo, por lo que creemos que el problema se suscitó durante la resuspensión de los condrocitos antes de la evaluación con 0.5 ml de solución de tripsina (tripsina 0.05%, EDTA 0.2 g.) a 37 °C por 5 minutos; a pesar que esta metodología para la resuspensión de células en monocapa es citada por muchos autores, tal vez en este caso no sea la mejor ya que por lo visto parece ser la causante del descenso de la supervivencia celular del cultivo, por lo que se recomendaría buscar algún otro tipo de metodología para la resuspensión de las células. A pesar que, la supervivencia celular fue menor a 1, esto no puede ser señal de que las células del cultivo hayan muerto durante este, ya que estas llegaron a proliferar; por tanto la baja tasa de supervivencia de este trabajo no puede ser considerada como la verdadera del cultivo, sino como aquella obtenida luego de aplicar al cultivo un paso con solución enzimática (tripsina) para la resuspensión

celular que debe ser mejor estudiado, ya que de este depende la obtención de una buena cantidad de células vivas.

Pese a los bajos resultados obtenidos en esta tesis en cuanto a supervivencia celular, se esperaba alcanzar resultados como los de Esfandiary et al., 2006; quienes al realizar un cultivo de condrocitos aislados de 50 pacientes que tuvieron operaciones a la rodilla y cadera, utilizando pronasa 1% por 2 horas a 37 °C y collagenasa 0.2% por 4 horas a 37 °C, cultivados en medio Ham's-F12 a una densidad de 500 000 – 1 000000 cél/ml a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>, y resuspendidos luego del periodo de cultivo con tripsina 0.05%/EDTA 1mM, obtuvieron mediante tinción con azul de tripan, un porcentaje de supervivencia celular de 95%. Así mismo, como los obtenidos por Lombello et al., 2003 quienes al realizar 11 cultivos de condrocitos de cartílago articular obtenido de 6 hombres y 3 mujeres (de 23-66 años) en medio HAMF12 suplementado con 1% de antibiótico, 10% de SBF por periodos de hasta 40 días, alcanzaron un porcentaje de supervivencia celular por encima del 90% en todos los casos. O lo obtenido por Milner et al., 2006; quienes empleando cartílago del espolón (metacarpofalangeal) de caballos sacrificados aislaron condrocitos con collagenasa (0.8-1.0 mg/ml) para poder determinar los efectos de la variación del oxígeno sobre el pH, basados en que la función de los condrocitos articulares es mejor comprendida bajo tensiones reales de oxígeno; por lo que empleando un medio estándar basada en la solución salina con buffer HEPES (HBS) para realizar análisis con radioisótopos y fluorométricos obtuvieron un porcentaje de viabilidad celular por encima del 95%, en ambos casos. Por otra parte, Kisiday et al., 2002 al realizar cultivos de condrocitos obtenidos de surcos femoropatelares de terneros de 1 a 2 semanas de edad en un medio, no mencionado por los autores, suplementado con 10% de SBF por 28 días; obtuvieron un porcentaje viabilidad celular de aproximadamente 80% en el cultivo en gel péptido, mientras que para la misma población de condrocitos sembrada en un cultivo paralelo

de agarosa, obtuvieron una viabilidad de aproximadamente 95%, luego de finalizado el periodo de cultivo.

En la actualidad existen diversas técnicas para la regeneración de lesiones del cartílago; entre ellas el autoinjerto obtenido a partir de una zona de no carga es una opción muy atractiva; sin embargo, esto supone la generación de una nueva lesión en esa área, por lo cual también sería una opción contraproducente. Así mismo, la opción de favorecer el paso de precursores mesenquimales mediante la intervención quirúrgica hasta llegar al hueso subcondral aún no ha mostrado buenos resultados a mediano-largo plazo. Por esto, el aislamiento de células condrales y su cultivo *ex vivo* representa la alternativa con mejores perspectivas, la técnica de implantación de condrocitos autólogos se basa en reproducir las condiciones del ambiente natural de las células obtenidas del propio paciente en un cultivo *in vitro* y mediante este hacerlas proliferar para luego ser implantadas en la zona lesionada; hoy por hoy esta técnica es una clara alternativa a aplicarse en ortopedia ya que es poseedora de diversas ventajas como que al ser un material autólogo, no representa problema de rechazo. No obstante, actualmente esta técnica se encuentra en fase clínica experimental, por lo que aún existen diversos factores que deben dilucidarse antes de emplear esta técnica de forma exclusivamente clínica.

## VII. CONCLUSIONES

---

1. Se obtuvo un cultivo primario de condrocitos a partir de cartílago hialino articular esternocostal de *Equus caballus* post-mortem en los medios BME + 10% SBF y TCM-199 + 10% SBF, siendo el primero el que presentó los mejores resultados.
2. La tasa de crecimiento del cultivo fue mayor a 1 solo para los medios BME + 10% SBF y TCM-199 + 10% SBF, siendo el primero el que mayor tasa de proliferación alcanzó.
3. La tasa de supervivencia, no superó el valor de 1 en ninguno de los casos, siendo las tasas que más se acercaban a este valor, las obtenidas con BME + 10% SBF y BME + 5% SBF; sin embargo, esto se le atribuye a problemas externos al cultivo celular.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMONTE-BECERRIL M. y KOURI F. J. Estudio de la Proliferación de Condrocitos obtenidos de Cartílago OA de Ratas Wistar. Laboratorio de Patología Osteoarticular, Centro de investigación y Estudios Avanzados (Cinvestav-IPN). México, 2006.

CANTÚ MARTÍNEZ, Héctor Agustín. Bioingeniería tisular de tejido cartilaginoso utilizando un andamio de gel de Ácido Hialurónico: Un estudio experimental. México; 2009.

EGERBACHER M., WOLFESBERGER B., and GABLER C. In Vitro Evidence for Effects of Magnesium Supplementation on Quinolone-treated Horse and Dog Chondrocytes. *Veterinary Pathology*. 2001 vol. 38, p. 143 – 148.

ESFANDIARY, Ebrahim, AMIRPOUR, Noshin, FESHARAKI, Mehrafarin, HOSSEIN NASR ESFAHANI, Mohammad, MOLAVI, Fariba, MOLAVI, Farahnaz, NAZEM, Khalilollah, RAZAVI, Shahnaz and SHAKIBAEI, Mehdi. Access to Chondrocyte Culture, with Alginate, In Iran. *Yakhteh Medical Journal*. 2008, vol. 10, nº 1, p. 73-75.

FERNÁNDEZ CANCIO, Mónica. Regulación por glucocorticoides y vitamina D de la proliferación y diferenciación de condrocitos de cartílago epifiseal fetal humano. Asesores: Prof. Antonio Carrascosa Lezcano, Dra. Laura Audí Parera y Dra. Cristina Esteban Redondo. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona, España, 2006.

FRESHNEY, RI. *Culture of Animal Cells a Manual of Basic Technique*. 5ta ed. Hoboken [N.J.]: Wiley, cop. 2005. 642 p. ISBN 0471453293

KISIDAY J., JIN M., KURZ B., HUNG H., SEMINO C., ZHANG S., and GRODZINSKY A.J.. Self-assembling peptide hydrogel fosters chondrocyte extracellular matrix production and cell division: Implications for cartilage tissue repair. *PNAS*. 2002, vol. 99, nº 15, p. 9996–10001.

LOMBELLO, Christiane, MARINS DOS REIS, Geraldo Jr. and COHEN, Moisés. Study on human chondrocyte culture viability for autologous transplantation in clinical application. *Einstein*. 2003, nº 1, p. 84-88.

MASRI M., IBARRA C., LOMBARDEO G. and PAASCH L. Situación Actual de la Reparación Condral en el Equino. *Veterinaria Mexico*. 2006, vol. 37, nº 3, p. 369-378.

MILNER P.I., FAIRFAX T.P.A., BROWNING J.A., WILKINS R.J. and GIBSON J.S. The Effect of O<sub>2</sub> Tension on pH Homeostasis in Equine Articular Chondrocytes. *Arthritis & Rheumatism*. 2006, vol. 54, nº 11, p. 3523-3532.

NEGRI S., FARINATO S., PAGLIARO P. and BELLOMI A. Tissue Engineering: Chondrocytes Culture on Type I Collagen Support. Cytohistological and Immunohistochemical Study. *Journal of Orthopaedics and Traumatology*. 2007, vol. 8, nº 2, p. 57-63.

PRUKSAKORN D., KHAMWAEN N., POTHACHAROEN P., ARPORNCHAYANON O., ROJANASTHIEN S., KONGTAWELERT P. Chondrogenic Properties of Primary Human Chondrocytes Culture in Hyaluronic Acid Treated Gelatin Scaffold. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 2009, vol. 92, nº4, p. 483-490

REDMAN S. N., OLDFIELD S. F. and ARCHER C. W. Currente Strategies for Articular Cartilage Repair. *European Cells and Materials*. 2005, vol. 9, p. 23 - 32.

RIGGS C. M. Osteochondral injury and joint disease in the athletic horse. *Equine Veterinary Education*. 2006, vol. 18, nº 2, p. 100-112.

ROSALES IBÁÑEZ, Raúl. Aislamiento y control de calidad de microanalítico para ingeniería tisular de los condrocitos del tejido cartilaginoso y hialino. Asesores: Dr. Antonio Campos Muñoz, Dr. Miguel Alaminos Mingorance y Dra. María del Carmen Sánchez Quevedo. Tesis doctoral. Universidad de Granada, Facultad de Medicina, España, 2008.

STEINERT, Andre F., GHIVIZZANI, Steven C., RETHWILM, Axel, TUAN, Rocky S., EVANS Christopher H. and NÖTH Ulrich. Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage. *Arthritis Research & Therapy*. 2007, vol. 9, nº 3, p. 1-15.



TRICE, Michael E., BUGBEE, William D., GREENWALD, A. Seth and HEIM, Christine S. *Articular Cartilage Restoration: A Review of Currently Available Methods for Repair of Articular Cartilage Defects*. In: *76 th Annual Meeting of American Academy of Orthopaedic Surgeons*. Las Vegas, Nevada, 25-28 February 2009.

YEN, Chi-Nan, LIN, Yu-Ru, CHANG, Margaret Dah-Tsyr, TIEN, Chun-Wen, WU, Yu-Chih, LIAO, Chun-Jen and HU, Yu-Chen. Use of Porous Alginate Sponges for Substantial Chondrocyte Expansion and Matrix Production: Effects of Seeding Density. *Biotechnology Progress*. 2008, vol. 24, p. 452-457.

## VIII. ANEXOS

**Tabla 10 Composición del Basal Medium Eagle (BME) 10X w/ Hanks` Salts w/o L-Glutamine w/o Sodium Bicarbonate (BIOWEST)**

Description	Quantity
<b>Amino Acids</b>	
L-Phenylalanine	16.500.000.000 mg/l
L-Isoleucine	26.000.000.000 mg/l
L-Threonine	24.000.000.000 mg/l
L-Leucine	26.000.000.000 mg/l
L-Arginine Monohydrochloride	21.000.000.000 mg/l
L-Tryptophan	4.000.000.000 mg/l
L-Lysine Monohydrochloride	36.470.000.000 mg/l
L-Cystine Dihydrochloride	15.650.000.000 mg/l
L-Tyrosine Disodium Salt Dihydrate	25.950.000.000 mg/l
L-Methionine	7.500.000.000 mg/l
L-Histidine	8.000.000.000 mg/l
L-Valine	23.500.000.000 mg/l
<b>Inorganic Salts</b>	
Sodium Chloride	80,000.00000000 mg/l
Calcium Chloride Dihydrate	1,850.00000000 mg/l
Sodium Phosphate Dibasic Anhydrous	47.880.000.000 mg/l
Magnesium Sulfate Anhydrous	97.670.000.000 mg/l
Potassium Chloride	4,000.00000000 mg/l
Potassium Phosphate Monobasic Anhydrous	60.000.000.000 mg/l
<b>Vitamins</b>	
Pyridoxal Hydrochloride	1.000.000.000 mg/l
D-Ca Pantothenate	1.000.000.000 mg/l
Riboflavin	100.000.000 mg/l
Folic Acid	1.000.000.000 mg/l
Thiamine Hydrochloride	1.000.000.000 mg/l
Myo-Inositol	2.000.000.000 mg/l
Choline Chloride	1.000.000.000 mg/l
Nicotinamide (Nicotinic acid amide)	1.000.000.000 mg/l
D-Biotin	1.000.000.000 mg/l
<b>Other Components</b>	
Phenol Red Sodium Salt	11.000.000.000 mg/l
D-Glucose Anhydrous	10,000.00000000 mg/l

**Tabla 11 Composición del Tissue Culture Medium-199 (TCM-199) w/ Hanks` Salts  
w/ L-Glutamine w/ 25mM Hepes (BIOWEST)**

Description	Quantity
<b>Amino Acids</b>	
DL-Glutamic Acid	13.360.000.000 mg/l
L-Lysine Monohydrochloride	7.000.000.000 mg/l
Glycine	5.000.000.000 mg/l
DL-Serine	5.000.000.000 mg/l
L-Cysteine Monohydrochloride Monohydrate	0.11000000 mg/l
DL-Aspartic Acid	6.000.000.000 mg/l
L-Proline	4.000.000.000 mg/l
DL-Phenylalanine	5.000.000.000 mg/l
L-Arginine Monohydrochloride	7.000.000.000 mg/l
DL-Threonine	6.000.000.000 mg/l
DL-Alanine	5.000.000.000 mg/l
L-Tyrosine Disodium Salt Dihydrate	5.766.000.000 mg/l
DL-Leucine	12.000.000.000 mg/l
L-Histidine Monohydrochloride Monohydrate	2.188.000.000 mg/l
DL-Tryptophan	2.000.000.000 mg/l
DL-Methionine	3.000.000.000 mg/l
DL-Isoleucine	4.000.000.000 mg/l
L-Hydroxy-L-Proline	1.000.000.000 mg/l
DL-Valine	5.000.000.000 mg/l
L-Glutamine	10.000.000.000 mg/l
L-Cystine Dihydrochloride	2.600.000.000 mg/l
<b>Inorganic Salts</b>	
Sodium Acetate Anhydrous	5.000.000.000 mg/l
Ferric Nitrate Nonahydrate	0.72000000 mg/l
Sodium Chloride	8,000.00000000 mg/l
Magnesium Sulfate Anhydrous	9.767.000.000 mg/l
Potassium Chloride	40.000.000.000 mg/l
Sodium Phosphate Dibasic Anhydrous	4.788.000.000 mg/l
Sodium Bicarbonate	35.000.000.000 mg/l
Potassium Phosphate Monobasic Anhydrous	6.000.000.000 mg/l
Calcium Chloride Dihydrate	18.500.000.000 mg/l
<b>Vitamins</b>	
Thiamine Hydrochloride	0.01000000 mg/l
Vitamine E	0.01000000 mg/l
P-Aminobenzoic Acid (PABA)	0.05000000 mg/l
Choline Chloride	0.50000000 mg/l
Riboflavin	0.01000000 mg/l
Myo-Inositol	0.05000000 mg/l
D-Biotin	0.01000000 mg/l
Pyridoxine Hydrochloride	0.02500000 mg/l
Menadione Sodium Bisulfite	0.01600000 mg/l

Nicotinamide (Nicotinic acid amide)	0.02500000 mg/l
D-Ca Pantothenate	0.01000000 mg/l
Ergocalciferol	0.10000000 mg/l
Ascorbic Acid	0.05660000 mg/l
Vitamine A Acetate	0.14000000 mg/l
Nicotinic Acid	0.02500000 mg/l
Folic Acid	0.01000000 mg/l
Pyridoxal Hydrochloride	0.02500000 mg/l
<b>Other Components</b>	
L-Glutathione Reduced	0.05000000 mg/l
Tween 80	2.000.000.000 mg/l
Adenine Sulfate	1.000.000.000 mg/l
Hepes Free Acid	5,958.00000000 mg/l
2 Deoxy-D-ribose	0.50000000 mg/l
D-Glucose Anhydrous	1,000.00000000 mg/l
Thymine	0.30000000 mg/l
Adenosine 5` Monophosphate	0.23850000 mg/l
Hypoxanthine	0.30000000 mg/l
Cholesterol	0.20000000 mg/l
Adenosine-5-Triphosphate x 2Na	100.000.000 mg/l
D-Ribose	0.50000000 mg/l
Uracil	0.30000000 mg/l
Guanine	0.30000000 mg/l
Xanthine + Na	0.34400000 mg/l
Phenol Red Sodium Salt	2.130.000.000 mg/l

**Tabla 12 Composición del Dulbecco's modified Eagle's médium (DMEN) High  
Glucose w/ stable Glutamine w/ 25mM Hepes (BIOWEST)**

Description	Quantity
<b>Amino Acids</b>	
L-Threonine	9.500.000.000 mg/l
L-Arginine Monohydrochloride	8.400.000.000 mg/l
L-Leucine	10.500.000.000 mg/l
L-Serine	4.200.000.000 mg/l
L-Valine	9.400.000.000 mg/l
Glycine	3.000.000.000 mg/l
L-Isoleucine	10.500.000.000 mg/l
L-Phenylalanine	6.600.000.000 mg/l
L-Tyrosine Disodium Salt Dihydrate	10.379.000.000 mg/l
L-Alanyl-L-Glutamine	58.400.000.000 mg/l
L-Histidine Monohydrochloride Monohydrate	4.200.000.000 mg/l
L-Methionine	3.000.000.000 mg/l
L-Tryptophan	1.600.000.000 mg/l
L-Cystine Dihydrochloride	6.260.000.000 mg/l
L-Lysine Monohydrochloride	14.600.000.000 mg/l
<b>Inorganic Salts</b>	
Calcium Chloride Dihydrate	26.500.000.000 mg/l
Sodium Bicarbonate	3,700.00000000 mg/l
Potassium Chloride	40.000.000.000 mg/l
Magnesium Sulfate Anhydrous	9.767.000.000 mg/l
Sodium Phosphate Monobasic Anhydrous	10.900.000.000 mg/l
Ferric Nitrate Nonahydrate	0.10000000 mg/l
Sodium Chloride	4,400.00000000 mg/l
<b>Vitamins</b>	
Riboflavin	0.40000000 mg/l
D-Ca Pantothenate	400.000.000 mg/l
Pyridoxal Hydrochloride	400.000.000 mg/l
Choline Chloride	400.000.000 mg/l
Nicotinamide (Nicotinic acid amide)	400.000.000 mg/l
Myo-Inositol	720.000.000 mg/l
Thiamine Hydrochloride	400.000.000 mg/l
Folic Acid	400.000.000 mg/l
<b>Other Components</b>	
Phenol Red Sodium Salt	1.590.000.000 mg/l
Hepes Free Acid	5,958.00000000 mg/l
D-Glucose Anhydrous	4,500.00000000 mg/l